

Charakterisierung und Bedeutung von ausgewählten Transportproteinen für die Virulenz von phytopathogenen Bakterien und Pilzen

**Dem Fachbereich Biologie der Technischen
Universität Kaiserslautern zur Erlangung
des akademischen Grades Doktor der
Naturwissenschaften eingereichte
Dissertation**

Vorgelegt von:

Claude Urbany
Kaiserslautern, im Dezember 2006

Berichterstatter:

Herr Professor Dr. H. Ekkehard Neuhaus

Herr Privatdozent Dr. Eckhard Thines

Inhaltsverzeichnis

	Abstract	IV
1	Einleitung	1
1.1	<i>Solanum tuberosum</i> , Geschichte einer süd-amerikanischen Nutzpflanze	1
1.2	Bakterielle Krankheitserreger der Kartoffelpflanzen	2
1.2.1	<i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i> (Eca), Erreger von Schwarzbeinigkeit und Knollennassfäule bei <i>Solanum tuberosum</i>	2
1.2.2	Mazeration des pflanzlichen Gewebes	4
1.3	<i>Magnaporthe grisea</i> , der Reisbranderreger: Interaktionen eines pathogenen Pilzes mit <i>Oryza sativa</i> einer bedeutenden Kulturpflanze	5
1.4	Transportproteine als Kontaktstellen zwischen pflanzlicher Resistenz und Virulenz von pflanzlichen Krankheitserregern	7
1.4.1	Eigenschaften membranständiger Transportsysteme	7
1.4.2	Proteintranslokation und Sekretion	8
1.4.3	Transportproteine, eine Klasse neuartiger Virulenzfaktoren?	8
1.5	Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr	10
1.6	Vorarbeiten	12
1.7	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Molekularbiologische Methoden	15
2.1.1	Bakterienstämme	15
2.1.2	Hefestämme, Medien und Anzuchtbedingungen	16
2.1.3	Vektoren und Konstrukte	18
2.1.4	Oligonukleotide	18
2.1.5	Rekombinante Techniken	20
2.1.5.1	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Zellen	20
2.1.5.2	Herstellung und Transformation von kompetenten <i>S.cerevisiae</i> Zellen	21
2.1.5.3	Herstellung und Transformation von kompetenten <i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i> Zellen	22
2.1.5.4	<i>In-vitro</i> -Manipulation von DNA	22
2.1.5.5	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.1.5.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	23
2.1.5.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen	24
2.1.5.8	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.1.5.9	Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	25
2.1.5.10	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	25
2.1.5.11	Herstellung eines Systems zur gezielten „Knock-out“-Mutagenese in <i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i> und Identifizierung von Mutanten	26
2.1.5.12	RNA-Isolierung	31
2.1.5.13	Formaldehyd-Gele zur Auftrennung von RNA-Molekülen	32
2.1.5.14	Transfer von RNA auf Nylonmembranen („Northern-Blotting“)	32
2.1.5.15	Fixierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	33
2.1.5.16	Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden	33
2.1.5.17	Hybridisierung der Gesamt-RNA mit DNA-Sonden	33
2.1.5.18	Phosphorimager-Analyse der radioaktiv markierten Membranen	34
2.1.5.19	DNA-Sequenzanalyse	34
2.2	Biochemische Methoden	34
2.2.1	Proteinbestimmung	34
2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.2.3	Western-Blot und Immuno-Printing	35
2.2.4	Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen im <i>E.coli</i> -Stamm	

	BL21 (DE3)pLysS bzw. im <i>E.coli</i> -Stamm C43 (DE3)	36
2.2.5	Anreicherung von Membranproteinen	36
2.2.6	Transportversuche an intakten <i>E.coli</i> -Zellen	37
2.2.7	Transportversuche an intakten <i>E.carotovora ssp. atroseptica</i> Zellen	37
2.2.8	Transportversuche an intakten <i>S.cerevisiae</i> -Zellen	38
2.2.9	Anzuchtversuche zur Determinierung des Wachstums und Stoffwechsels von <i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i> unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen	38
2.2.10	Hefekomplementation	39
2.2.11	Erwinien-Komplementation	40
2.2.12	Bestimmung der Citrat-Konzentration an <i>S.tuberosum</i> Knollengewebe	41
2.2.13	Veränderung von Metaboliten in <i>S.tuberosum</i> Knollengewebe in Gegenwart oder Abwesenheit von <i>Eca</i>	41
2.3	Phytopathologische Methoden	42
2.3.1	Inokulation von Kartoffelknollengewebe mit <i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i> Zellen	42
2.3.2	Inokulation von Kartoffelknollengewebe mit <i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i> Zellen unter anaeroben Bedingungen	43
2.3.3	Vakuum-Infiltration von Kartoffelscheibchen	43
2.3.4	Inokulation von ganzen Kartoffelknollen mit <i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i> Zellen	43
2.3.5	Untersuchung der pektolytischen Aktivität auf PEC-Platten	44
2.3.6	Bestimmung der Colony forming Units (CFU) nach Inokulation von Kartoffel Knollenscheibchen mit <i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i>	45
2.4	Elektronische Datenverarbeitung und Computergestützte Analysen	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Untersuchungen zur Prolinaufnahme und deren Bedeutung für die Virulenz anhand von <i>Eca</i> „K.O.“-Mutanten	47
3.1.1	ECA4218; ein putativer Natrium-gekoppelter Prolin-Transporter	48
3.1.1.1	Molekulare Charakterisierung	48
3.1.1.2	Biochemische Charakterisierung	52
3.1.1.3	Phytopathologische Charakterisierung	53
3.1.2	ECA3503; ein System zur Aufnahme osmotische aktiver Substanzen	55
3.1.2.1	Molekulare Charakterisierung	56
3.1.2.2	Biochemische Charakterisierung	58
3.1.2.3	Phytopathologische Charakterisierung	59
3.2	Untersuchungen zur d-Galaktوناتaufnahme und deren Bedeutung für die Virulenz anhand von <i>Eca</i> „K.O.“-Mutanten	60
3.2.1	Molekulare Charakterisierung	61
3.2.2	Biochemische Charakterisierung	64
3.2.3	Phytopathologische Charakterisierung	64
3.3	Untersuchungen zur Karbonsäure-Aufnahme, Verwertung sowie deren Bedeutung für die Virulenz von <i>Eca</i> „K.O.“-Mutanten.	66
3.3.1	ECA3984; Karboxylat-Transporter oder Natrium gekoppelter Sulfat-Transporter?	67
3.3.1.1	Molekulare Charakterisierung	67
3.3.1.2	Biochemische Charakterisierung	70
3.3.1.2.1	Sequenzanalyse	70
3.3.1.2.2	Citrat-Verwertung	72
3.3.1.2.3	Wachstumsstudien	73
3.3.1.2.4	Aufnahmestudien an intakten <i>Eca</i> -Zellen	74
3.3.1.2.5	Komplementation der <i>Eca cit1::kan^R</i> Mutante	78
3.3.1.3	Phytopathologische Charakterisierung	79
3.3.1.3.1	Auswirkungen einer unterbrochenen <i>cit1</i> Sequenz auf das Wachstum von <i>Eca</i> auf Kartoffelknollengewebe	81

3.3.1.3.2	Metaboliten-Bestimmung an Kartoffelknollengewebe	82
3.3.1.3.3	Knollenscheibchentest mit Wildtyp und NTT-antisense Kartoffelpflanzen	85
3.3.1.3.4	Infiltrationsversuche an WT und NTT-antisense Kartoffelgewebe	86
3.3.2	ECA4400, ein weiterer putativer Karbonsäure-Transporter?	90
3.3.2.1	Molekulare Charakterisierung	90
3.3.2.2	Biochemische Charakterisierung	93
3.3.2.2.1	Citrat-Verwertung	93
3.3.2.3	Phytopathologische Charakterisierung	94
3.3.3	ECA0620, ein anaerober Malat-Carrier	95
3.3.3.1	Molekulare Charakterisierung	95
3.3.3.2	Biochemische Charakterisierung	98
3.3.3.3	Phytopathologische Charakterisierung	100
3.3.4	ECA2207; Regulator anaerober Stoffwechselprozesse	101
3.3.4.1	Molekulare Charakterisierung	101
3.3.4.2	Biochemische Charakterisierung	104
3.3.4.3	Phytopathologische Charakterisierung	106
3.4	Biochemische Charakterisierung von Transportproteinen aus <i>Magnaporthe grisea</i>	107
4	Diskussion	110
4.1	Ziele einer „K.O.“-Mutagenese	111
4.1.1	Ein neues System zur Erzeugung von <i>Eca</i> Mutanten	111
4.2	<i>Eca</i> -Mutanten zum Prolintransport	112
4.3	<i>Eca</i> -Mutanten zum Galaktonattransport	116
4.4	<i>Eca</i> -Mutanten zum Karbonsäuretransport	118
4.4.1	Karbonsäure- und Sulfat-Transporter, verschieden und dennoch nicht klar abgrenzbar	119
4.4.2	Biochemische Funktionsanalyse des ECA3984 Proteins	120
4.4.2.1	Citrat-Verwertung des <i>Eca</i> Wildtypen und der 3984::kan ^R Mutante	120
4.4.2.2	Biochemische Charakterisierungen der Citrat-Aufnahme durch <i>Eca</i>	121
4.4.2.3	Klassifizierung des Cit1 Transportproteins aus <i>Eca</i> als neues Mitglied der DASS-Transporterfamilie	123
4.4.3	Bedeutung des Cit1 Proteins für die Virulenz von <i>Eca</i> bei Befall von Kartoffelknollengewebe	125
4.4.3.1	Citrat ein ambivalentes Metabolit bei der Mazeration von Wildtyp und NTT-antisense Kartoffelgewebe durch <i>Eca</i>	127
4.4.4	ECA4400, Homolog des Cit1 Proteins und ein weiterer Citrat-Transporter?	130
4.4.4.1	Einordnung der Biochemie des ECA4400 Proteins bezüglich der Citratverwertung und Auswirkungen eines unterbrochenen <i>Eca4400</i> Gens auf die Pathogenese von <i>Eca</i>	130
4.4.5	Malat-Aufnahme durch <i>Eca</i> und Identifizierung des ECA0620 Proteins als Malat-Carrier	131
4.4.6	Regulation und Anpassung des Karbonsäurestoffwechsels von <i>Eca</i> bei Befall von Knollengewebe	132
4.4.7	Bedeutung und ambivalenten Funktion von Citrat und dem Karbonsäurestoffwechsel sowie seiner Regulation für die Pathogenese von <i>Eca</i> auf Kartoffelknollengewebe	135
4.5	Transportproteine aus <i>M.grisea</i> , Virulenzfaktoren per Analogie	140
5	Zusammenfassung	142
6	Literaturverzeichnis	144
7	Anhang	159

Abstract

Durch vorangegangene Arbeiten wurden transgene Kartoffelpflanzen erzeugt, die eine verringerte Aktivität des plastidären ATP/ADP Transporters aufweisen (NTT-antisense). Die Knollen dieser Pflanzen zeigen nicht nur veränderte Gehalte an Primärmetaboliten sondern auch eine erhöhte Pathogen-Resistenz, zum Beispiel gegen den bakteriellen Krankheitserreger *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* (*Eca*). In diesem Zusammenhang deuten neuere Veröffentlichungen auf eine Bedeutung von Transportproteinen für Wirt-Pathogen Wechselwirkungen hin. Im Zuge dieser Arbeit konnte durch die Herstellung eines Systems zur gezielten Erzeugung von *Eca* „K.O.“-Mutanten die Bedeutung von ausgewählten Sequenzen, welche für Transportproteine kodieren, analysiert werden. Hierbei zeigte sich, dass im Bezug auf die Virulenz von *Eca*, sowohl der Prolin- als auch der d-Galaktonattransport nur von untergeordneter Bedeutung ist. In weiteren Untersuchungen wurde allerdings der Karbonsäuremetabolismus und -transport von *Eca* als zentrales Element in der Entfaltung maximaler bakterieller Virulenz erkannt. Hierbei wurde das Cit1-Protein als hoch-affiner Citrattransporter, welcher über die bakterielle pmf energetisiert wird, identifiziert. Dieses Protein ist für ein Wachstum von *Eca* auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle notwendig und essentiell zur Etablierung einer vollständigen Pathogenese auf Kartoffelknollenscheibchen. So weisen *Eca cit1* „K.O.“-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp Zellen nicht nur eine geringere pektolytische Aktivität und Gewebemazeration, sondern auch ein reduziertes *in planta* Wachstum, auf. Des Weiteren wurde ermittelt, dass sich NTT-antisense Gewebe nicht nur durch eine erhöhte Pathogen-Resistenz auszeichnet, sondern auch erniedrigte Citratgehalte aufweist. Analog führte eine artifizielle Erhöhung des Citratgehaltes durch Infiltration von Knollengewebe zu einer deutlich erhöhten Gewebemazeration durch *Eca* sowie einer verringerten Akkumulation von Abwehr-relevanten pflanzlichen Gentranskripten (PR-Gene). Weitere untersuchte *Eca*-Mutanten belegten, dass im gemeinsamen Wirken mit anderen enzymatischen Komponenten, Citrat ein ambivalentes Molekül für pflanzliche Resistenz und bakterielle Virulenz ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Transportproteine nicht nur für die Virulenz von *Eca*, sondern auch für phytopathogene Pilze wie *Magnaporthe grisea*, von Bedeutung sind. So konnte durch die Kooperation mit der AG Thines (IBWF) das Genprodukt eines bei Pathogenese induzierten Genes (*rig2*), biochemisch charakterisiert werden. Hierbei wurde mittels Komplementation einer Hefemutante (22Δ8AA) nachgewiesen, dass es sich bei diesem Protein um einen Prolin-Transporter handelt.

Diese Arbeit zeigt, dass Transportproteine als ein wichtiges Element in Wirt-Pathogen Beziehungen wirken können und eine Charakterisierung solcher Proteine zum Verständnis dieser Wechselwirkungen unerlässlich ist.

Abstract

Transgenic potato tubers exhibiting reduced levels of the plastidic ATP/ADP transporter (NTT antisense) show altered primary metabolite levels and substantially increased resistance against the necrotrophic plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (*Eca*). Investigations by several research groups on erwinial gene transcription identified transportproteins as putative virulence factors. Analysis of specific *Eca* carriers by means of targeted mutagenesis relying on a newly developed knock-out system (this work) led to the conclusion that both proline and d-galactonate uptake are not essential for erwinial virulence on potato tuber discs. In similiar experiments *Eca* virulence seemed to depend on a functional carboxylate metabolism and uptake. Further investigations showed that citrate uptake plays a crucial role for *Eca* in establishing tissue maceration. To analyse the effect of citrate import into *Eca* cells on the bacterial virulence we studied the function of various carboxylate-carrier proteins. One of the corresponding, *ECA3984*, encodes a highly specific citrate transporter (*EcaCit1*) energised by the proton-motive force. Knock-out mutants lacking the functional *EcaCit1* protein did not grow in medium containing citrate as the sole carbon source and showed a substantially reduced ability to macerate potato tuber tissue and a reduced *in-planta* growth. Furthermore we discovered that NTT-antisense tubers do not only display a enhanced pathogen resistance but also markedly decreased levels of citrate. Citrate feeding into both, *Eca* resistant (NTT-antisense) and wild type tuber tissue resulted in an increased maceration efficiency. In addition citrate feeding into wild type and NTT-antisense tuber tissue decreased the expression of pathogen related genes upon challenging the tuber tissue with elicitors of plant resistance. Therefore citrate uptake into *Eca* is critical for full bacterial virulence and low citrate levels in potato tuber tissue contribute to the resistance against this pathogen.

The impact of transportproteins on virulence is not restricted to *Eca* but was also demonstrated for *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus. Specific genes of *M. grisea* induced upon pathogenesis and coding for transporters were characterised on the molecular and phytopathogenic level by the research group Thines (IBWF). In this work the biochemical characterisation of one of these carriers was achieved. By complementation studies on yeast mutants the Rig2 of *M. grisea* protein was identified to be a proline-carrier.

The results of this work show that some transportproteins can be considered as virulence factors and that the characterisation of such proteins allows a deeper understanding of host-pathogen interactions and the involved key-metabolites.

1 Einleitung

Der Begriff Weltbevölkerung bezeichnet die geschätzte Anzahl der Menschen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt auf der Erde lebten oder hochgerechnet leben werden. Momentan umfasst die Weltbevölkerung ungefähr 6,6 Milliarden Menschen (Weltbevölkerungsbericht 1999, Bevölkerungsfonds der Vereinten Nationen UNFPA).

Der überwiegende Anteil des Bevölkerungswachstums findet derzeit in den Entwicklungsländern bzw. ärmeren Staaten der Welt statt. So erwartet die UNO bei mittlerer Projektion (konstanter Fertilitätsfaktor von 1,85) bis zum Jahre 2025 eine Weltbevölkerung von ca. 7,9 Milliarden und bis 2050 gar 9,1 Milliarden Menschen (Weltbevölkerungsbericht 1999, Bevölkerungsfonds der Vereinten Nationen UNFPA).

Zur Sicherung einer Nahrungsgrundlage, besonders im Hinblick einer derartig schnell wachsenden Weltbevölkerung, bedarf es in der Zukunft einer effizienten und gesicherten Landwirtschaft.

1.1 *Solanum tuberosum*, Geschichte einer süd-amerikanischen Nutzpflanze

In diesem Zusammenhang kommt einer Optimierung der Nutzpflanzen-Wirtschaft eine wichtige Rolle zu. Neben verschiedenen Getreidepflanzen, Reis, Soja oder Raps gehört auch die Kartoffel zu den erwähnten Nutzpflanzen. Weltweit werden jährlich etwa 300 Millionen Tonnen Kartoffeln geerntet, wobei 73% der Welternte von 12 Staaten erbracht werden. In Mitteleuropa, so auch in Deutschland sind Kartoffelknollen das Hauptgrundnahrungsmittel mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 68,4 kg pro Jahr (Review of the State of Food and Agriculture, Food and Agriculture Organisation of the United Nations FAO).

Der Ursprung der heutigen Nutzpflanze liegt in den Anden Südamerikas, wo noch heute zahlreiche Knollen-Bildende Wildformen vorkommen (Franke, 1989). Zunächst als reine Zierpflanze importiert gelang der Kartoffel erst gegen Ende des 18. Jahrhunderts der Durchbruch als allgemeines Nahrungsmittel. Als solches ist allerdings nur die Sprossknolle der eigentlichen Pflanze zu verwenden. Diese ist wie schon angedeutet eine endständige Verdickung modifizierter Sprossachsen, Rhizome, die der Pflanze als Speicherorgan dienen. Anfänglich schmälerete vor allem der kratzige und brennende Geschmack der Knollen aufgrund des damals noch höheren Gehalts an Solanin die Akzeptanz der Kartoffelknolle als Speise. Weiterhin bildeten die an den tropischen Kurztag gewöhnten Pflanzen im europäischen Langtag zwar meterlange Ausläufer, jedoch kaum Knollen aus. Folglich wurde in erster Linie versucht Form, Geschmack und Ertrag der Knollen zu verbessern. Durch das

Verfolgen dieser Ziele und dem zu diesem Zeitpunkt kaum vorhandene Wissen über Pathogene, wurde vermutlich kein besonderes Augenmerk auf die Züchtung resistenter Sorten gelegt. Dies führte dazu, dass natürliche Resistenzen gegen Krankheiten und Parasiten, welche in den südamerikanischen Wildformen der Kartoffel noch anzutreffen sind, durch die züchterische Tätigkeit verloren gingen. Die ersten schweren Kartoffelseuchen traten dann zu Beginn des 19. Jahrhunderts auf, nach dem die Kartoffel in ganz Europa eine wichtige Nahrungsgrundlage geworden war.

Um 1845 wirkte sich in Irland, die von *Phytophthora infestans* verursachte Kraut- und Knollenfäule verheerend aus und vernichtete später in Deutschland ganze Erntebestände. Heutzutage treten zwar durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln keine Epidemien mehr auf, doch die Verluste durch Pflanzenkrankheiten sind nach wie vor enorm und machen schätzungsweise 22% des potenziellen Ertrages aus (Cramer, 1967). So gehört die Kartoffel neben Raps unter den großen heimischen Ackerbaukulturen zu den Pflanzen, die am stärksten durch Krankheiten und Schädlinge heimgesucht werden.

1.2 Bakterielle Krankheitserreger der Kartoffelpflanzen

Neben Schädlingen wie Nematoden und Kartoffelkäfer sowie Viren und Pilzen, vermögen ebenfalls Bakterien die Kartoffelpflanze und deren Knollen zu befallen. Löst ein solches Bakterium bei Befall von Kartoffelpflanzen eine Krankheit aus, so wird es als Pathogen (Krankheitserreger) bezeichnet. Zu den wichtigsten Erregern zählen *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* und *Streptomyces scabies*. *Clavibacter michiganensis* ist der Verursacher der Bakterienringfäule, die in Mitteleuropa lediglich geringe Schäden verursacht (Langerfeld, 1989). *Ralstonia solanacearum* bewirkt bei Kartoffelpflanzen Braunfäule und Schleimkrankheit, hat jedoch in Mittel- und Nordeuropa so gut wie keine Bedeutung (Walker, 1992). Der Kartoffelschorf, der durch das Bakterium *Streptomyces scabies* verursacht wird, kommt in allen Regionen mit Kartoffelanbau vor, verursacht jedoch in der Regel keine Ertragsminderung, sondern lediglich eine Qualitätseinbuße bei Speise- und Verarbeitungskartoffeln (Heitefuss *et al.*, 1993).

1.2.1 *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (Eca), Erreger von Schwarzbeinigkeit und Knollennassfäule bei *Solanum tuberosum*

Eine große wirtschaftliche Bedeutung hat das, zu der Familie Enterobacteriaceae gehörende, phytopathogene Bakterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, welches bei Kartoffelpflanzen zum einen die Schwarzbeinigkeit, „black leg“, und zum anderen bei der

Knolle die Knollennassfäule, „soft rot“ verursacht. Während der Vegetation können die Schäden im Bestand durch Schwarzbeinigkeit 30% und mehr betragen. Unter ungünstigen Lagerbedingungen kann es durch die schnelle Ausbreitung der Knollennassfäule zu Totalverlusten innerhalb eines Lagerbestands kommen. Im langjährigen Mittel kann von einer Verlustquote von 5 bis 8% ausgegangen werden. Die weltweiten Verluste durch diese Krankheit werden auf 50 bis 100 Millionen US\$ geschätzt (Pérombelon & Kelman, 1980). Aus diesem Grund gilt *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* als einer der bedeutendsten Krankheitserreger der Kartoffel.

Von Schwarzbeinigkeit befallene Pflanzen weisen Vergilbungen an Einzeltrieben oder mehreren Sprossen auf die zu Wachstumseinbußen führen. Die Pflanzen lassen sich leicht aus dem Boden ziehen und zeigen an der Stengelbasis eine typische Schwarzfärbung mit starker Gewebeerstörung. Entscheidend für die Infektion der Pflanze ist die Übertragung des Erregers durch befallene, angefaulte Knollen bzw. durch latent verseuchtes oder äußerlich kontaminiertes Pflanzgut (Molina & Harrison, 1977).

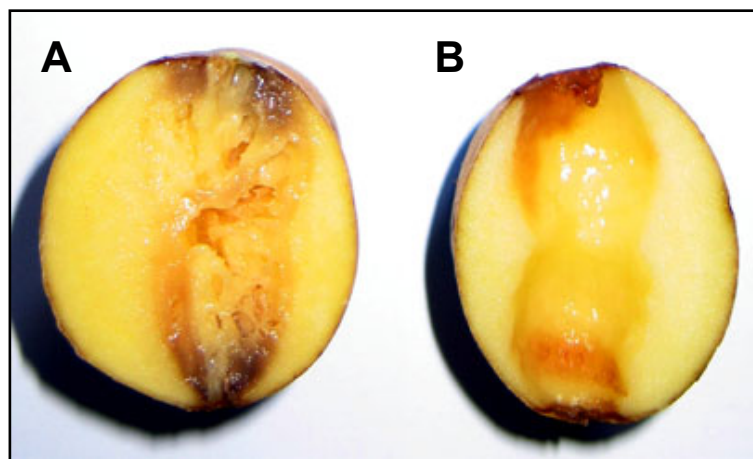


Abb. 1: Krankheitssymptome der durch *Eca* bedingten Knollennassfäule. Nach dem Inokulieren von Knollen mit ca. 20000 *Eca*-Zellen wurden diese nach dreitägiger Inkubation halbiert. (A) Knollennassfäule: Die mazerierten Gewebereiche wurden nach Halbieren der Knollen belassen und fotografiert. (B) Restliches Gewebe: Nach dem Abwaschen befallener Bereiche, bleibt bisher noch intaktes Gewebe zurück.

Die durch *Erwinia* bedingte Knollennassfäule beginnt im Boden vor allem bei feuchtkaltem Wetter. Sie äußert sich dadurch, dass das Knollenfleisch lokal Wasserdurchtränkt ist und dann in eine weißliche bis rosa getönte, breiige Masse übergeht, die nur durch die Schale zusammengehalten wird. Schwach erkrankte oder bei der Ernte kontaminierte Knollen zeigen dieses Erscheinungsbild erst im Lager. Dort gehen der Faulbrei und die darin enthaltenen Erreger auf benachbarte Knollen über und es entstehen um sich greifende Fäulnisherde. Erwiesenermaßen haben die Lagerbedingungen einen großen Einfluss auf das Auftreten der Knollenweichfäule. Insbesondere Temperatur, Luftfeuchtigkeit

und CO₂-Gehalt sind hierbei entscheidend (Pérombelon & Kelman, 1980; Pérombelon & Lowe, 1975). Vor allem ein erhöhter CO₂- und ein verminderter O₂-Gehalt potenzieren die Fäulnisrate (Ramsey *et al.*, 1944; Lipton, 1967; Scholey *et al.*, 1968; Nielsen, 1968; Workman & Twomey, 1970; Lund & Wyatt, 1972).

1.2.2 Mazeration des pflanzlichen Gewebes

Der Krankheitsverlauf von Knollennassfäule beginnt mit dem Eindringen der Bakterien über Lentizellen oder Wunden in die Knolle. Dort erfolgt auch die Ausbreitung und Vermehrung der Erreger in den interzellulären Räumen des Speicherparenchyms. Die Virulenz von *Erwinia carotovora ssp. atroseptica*, also das Ausmaß oder der Grad in einem empfänglichen Wirt eine Erkrankung auszulösen, beruht hauptsächlich auf der Sekretion von Zellwand-abbauenden Enzymen (Cell Wall Degrading Enzymes, CWDE). Mit Hilfe eines Messsystems, welches einer Bakterienpopulation erlaubt ihre eigene Zelldichte zu ermitteln, einem so genannten „quorum-sensing“ gesteuerten Mechanismus (Eriksson *et al.*, 1998, Harris *et al.* 1998, Henke & Bassler 2004, Thomson *et al.* 1997, Burr *et al.* 2006), wird die Expression der Virulenzfaktoren gesteuert. Erst nach dem Erreichen einer gewissen Zelldichte (also einer Populationsgröße) erfolgt dann der eigentliche Angriff durch Synthese und Sekretion von CWDEs (Pirhonen *et al.*, 1993; Wharam *et al.*, 1995), was zur Zerstörung des pflanzlichen Gewebes führt. Zu den CWDEs gehören Pektinasen, Cellulasen und Proteasen, die das pflanzliche Gewebe mazerieren und somit Nährstoffe freisetzen die im Folgenden den Bakterien zum Wachstum dienen (Collmer & Keen, 1986; Kotoujansky, 1987; Pirhonen *et al.*, 1991). Diese Enzyme, insbesondere Pektinasen, scheinen eine ambivalente Rolle bei der Interaktion des Bakteriums mit der Pflanze zu spielen. Zum einen stellen sie die hauptsächlich bakteriellen Virulenzfaktoren dar, zum anderen induzieren sie jedoch auch die Pathogenabwehr in den betroffenen Pflanzen (Davis *et al.*, 1984; Pavla *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 1997; 1998).

Um pflanzliche Zellwände abzubauen, sekretiert *Erwinia* eine Reihe von Proteinen zu denen neben pektolytischen Enzymen auch Cellulasen, Proteasen und Xylanasen gehören (Collmer & Keen, 1986; Kotoujansky, 1987). Das in der Zellwand befindliche Pektin wird durch Wirken einer Pektinmethylesterase demethyliert (Laurent *et al.*, 1993), das hierbei freiwerdende Polypektat und Polygalakturonat wird dann einerseits durch die Pektatlyase zu ungesättigten Oligogalakturoniden abgebaut (Collmer & Keen, 1986) und andererseits von Polygalakturonase durch Hydrolyse in gesättigte Oligogalakturonide gespalten (He & Collmer, 1990). Cellulose, ein weiterer wichtiger Bestandteil der pflanzlichen Zellwand kann durch die Cellulase, eine β -1,4-Endoglucanase in Cellobiose umgesetzt werden (Barras *et al.*, 1992).

Wie bereits erwähnt, richtet unter den bakteriellen Erregern *Erwinia carotovora* bei der Kartoffel die größten Schäden an. Da konventionelle Züchtungsversuche bislang nicht zu Sorten mit einer erhöhten *Erwinia*-Resistenz führten und Kartoffeln aufgrund ihrer genetisch äußerst komplexen Struktur nur schwer veränderbar sind (Sinden *et al.*, 1993), bietet die Gentechnik Möglichkeiten, bestehende Probleme mit neuen Strategien zu lösen. Besonders das Aufklären des bakteriellen Stoffwechsels und die Charakterisierung bisher unbekannter Proteine können neue Wege in der Bekämpfung von *Erwinia* und anderen Phytopathogenen aufdecken. Transportproteine sind in diesem Zusammenhang sehr interessante Enzyme, deren Bedeutung für Stoffwechsel und Krankheitsverlauf durch Charakterisierung mittels gentechnischer und biochemischer Methoden, neue Einblicke in die Pathogenese bakterieller Krankheitserreger ermöglicht hat (Weinstock, 2000). Auch im Falle von *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* können hierdurch, besonders im Hinblick auf die bereits aufgeklärten Abläufe beim Befall pflanzlichen Gewebes, neue Strategien zur Bekämpfung der Krankheitserreger ausgearbeitet werden.

1.3 *Magnaporthe grisea*, der Reisbranderreger: Interaktionen eines pathogenen Pilzes mit *Oryza sativa* einer bedeutenden Kulturpflanze

Nicht nur die bisher beschriebenen Interaktionen zwischen phytopathogenen Bakterien und *S.tuberosum* sind von großer wirtschaftlicher und biologischer Bedeutung. Auch pathogenen Pilzen kommt eine wichtige Rolle beim Auslösen von Krankheiten und dem Befall von Nutzpflanzen zu. Eine sehr interessante Interaktion ist hierbei der Befall von *Oryza sativa* (Reis) durch den Reisbrand-Erreger *Magnaporthe grisea*. Reis ist bekanntermaßen die primäre Nahrungsquelle für mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung (Food and Agricultural Organisation USA-FAO, 2004). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit einer Überwachung als auch einer Verbesserung des Reisanbaus und der Produktion. So konnte durch Züchtungserfolge in den letzten vier Jahrzehnten eine Ertragssteigerung erreicht werden. Das klassische Hybridisierungs- und Selektionsverfahren scheint jedoch ausgereizt zu sein und weist nicht mehr das nötige Potenzial auf, um durchschlagende Erfolge bei der zukünftigen Verbesserung von Reis-Varietäten zu bieten (International Rice Research Institute IRRI, 2004).

Ein anderer Ansatz zur Sicherung und Steigerung der Produktion ist die Schadminimierung, die durch diverse Pathogene verursacht wird. Zum einen kann dies durch eine direkte Bekämpfung des Pathogens erfolgen, zum anderen aber auch durch eine Verbesserung der Pflanze gegenüber dem jeweiligen Schädling. In diesem Zusammenhang, ist vor allem *Magnaporthe grisea* zu nennen, der Erreger des Reisbrandes (Talbot, 2003).

Das von ihm verursachte Schadbild führte im Zeitraum von 1975 bis 1990 zu einem weltweiten Verlust von 157 Millionen Tonnen Reis und kann zu einem Verlust der Jahresernte von 10-15 Prozent führen (Zeigler, 1998).

Als Ascomycet stellt *Magnaporthe grisea* ein extrem effizientes Pflanzenpathogen dar. Es ist dem Pilz möglich sich sexuell als auch asexuell fortzupflanzen. Hierbei beginnt der asexuelle Fortpflanzungszyklus mit der Sporulation des Pilzmycels das folglich Konidienträger ausbildet, die eine Vielzahl an Sporen hervorbringen. Nachdem eine solche Spore auf einem Blatt oder sonstigen autotrophen Strukturen einer suszeptiblen (anfälligen) Pflanze eingebracht wurde, beginnt diese zu keimen und ein Appressorium auszubilden (Agrios, 1997). Über diese spezielle Struktur schafft es *M.grisea* in das pflanzliche Gewebe einzudringen. Hierbei wird ein hoher mechanischer Druck innerhalb des Appressoriums aufgebaut durch den sogar die pflanzliche Kutikula aufgebrochen werden kann, was ein Eindringen des Pilzes in die pflanzliche Zelle ermöglicht (Thines *et al.*, 2000). Nach der Penetration beginnt das intrazelluläre Wachstum von *M.grisea* durch das Ausbilden von neuen Pilzhyphen. Hat eine erfolgreiche Infektion der Pflanze stattgefunden kann durch Ausbilden von Konidiophoren und schließlich Konidien ein neuer asexueller Zyklus begonnen werden. Sexuelle Fortpflanzung findet nur statt, wenn zwei Stämme unterschiedlicher Paarungstypen sich begegnen und ein Perithezium ausbilden um Ascosporen zu produzieren. Diese werden wiederum über die Luft verbreitet und können auf pflanzlichem Gewebe wiederum auskeimen (Agrios, 1997). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es *M.grisea* auch möglich ist Pflanzen über die Wurzel zu befallen (Dufresne & Osbourn, 2001). Durch das Wachstum und der Produktion neuer Hyphen innerhalb des pflanzlichen Gewebes bilden sich Läsionen, welche die photosynthetische Kapazität deutlich vermindern. Einhergehend mit dem Unterbinden einer vaskulären Versorgung und der Produktion pilzlicher Toxine wird die Pflanze unabänderlich geschädigt (Agrios, 1997).

Da ein Befall durch *M.grisea* bisher nur durch die Anwendung von relativ teuren und starken Fungiziden unter Kontrolle gebracht werden kann, ist das Verständnis der Interaktionen zwischen Pilz und Pflanze während der Pathogenese von außerordentlicher Wichtigkeit. Vor allem die Identifikation von Genen, welche bei der frühen Phase der Penetration des Pilzes in das pflanzliche Gewebe induziert werden ist von hohem Interesse. So gibt es Hinweise, dass verschiedene Transportproteine unter diesen Bedingungen von hoher Relevanz sind (Becker, Daten nicht publiziert). Die Charakterisierung solcher Gene trägt dazu bei, die ablaufenden Prozesse zu verstehen und sogar gezielt zu manipulieren. Hierdurch ist es unter Umständen möglich neue Strategien zur molekularen Bekämpfung diese Pathogen zu entwickeln.

1.4 Transportproteine als Kontaktstellen zwischen pflanzlicher Resistenz und Virulenz von pflanzlichen Krankheitserregern

1.4.1 Eigenschaften membranständiger Transportsysteme

Lebewesen zeichnen sich nicht nur durch Kommunikation untereinander aus, sondern kommunizieren vor allem auch chemisch, physikalisch und biologisch mit ihrer Umgebung. Da sich jedoch lebende Zellen durch eine biologische Membran von ihrer Umwelt abgrenzen, bedarf es Kontaktstellen, welche einen Austausch von Molekülen oder anderen Stoffen ermöglichen. In lebenden Systemen stellen z.B. Transportproteine diese Kontakte dar. Somit sind Sie essenzielle Schaltstellen, um sowohl zellulären Kompartimenten als auch ganzen Zellen den Austausch verschiedenster Substanzen untereinander und mit ihrer Umwelt zu ermöglichen.

So erlauben Transportproteine, Lebewesen nicht nur die Aufnahme essenzieller Stoffe wie zum Beispiel Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor, sondern sie ermöglichen auch Flüsse und Konzentrationen verschiedenster Metabolite gezielt zu regulieren. Auch der Austausch von DNA und somit ein Grundbaustein der Evolution beruht auf ihnen. Transporter befähigen Zellen jedoch auch, Proteine oder Substanzen in ihre Umwelt abzugeben die Verteidigung, Schutz aber auch Angriff gegenüber anderen Lebewesen oder Strukturen bieten. Schlussendlich können auch toxische Substanzen über Transporter ausgeschleust oder Membranpotenziale aufrechterhalten werden (Saier, 2000).

Fast alle transmembranen Transportprozesse werden durch integrale Membranproteine vermittelt. Vor allem für Moleküle, die aufgrund ihrer Größe oder Ladung die hydrophoben Membranen nicht mittels Diffusion durchdringen können, katalysieren integrale Membranproteine deren aktiven oder passiven Transport. Hierbei unterscheidet man hauptsächlich zwei verschiedenen Klassen: Kanäle und Carrier. Kanäle erleichtern in einem Diffusions-abhängigen Prozess den Wechsel einer Substanz von einer Seite der Membran auf die andere (Saier, 2000). Die treibende Kraft hierbei ist zumeist ein elektrochemischer Konzentrationsgradient. Carrier weisen meistens weitaus geringere Transportraten als Kanäle auf. Es handelt sich hierbei um Proteine, die ihr Substrat spezifisch binden und es, indem sie verschiedene Konformationsänderungen durchlaufen, durch die Membran transportieren (Varela & Wilson, 1996; West, 1997). Wird nur ein Substrat transportiert, so spricht man von Uniport. Als Symport wird ein Transportvorgang bezeichnet bei dem zwei Substrate gleichzeitig in eine Richtung transportiert werden wohingegen ein Antiport einen Transport zweier Substrate in entgegengesetzter Richtungen darstellt.

1.4.2 Proteintranslokation und Sekretion

Wie oben erwähnt können auch Proteine über Membranen transportiert werden. Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien setzt sich aus zwei Membranschichten zusammen, der zytoplasmatischen Membran und der äußeren Membran. Das Durchschleusen eines Proteins durch die zytoplasmatische Membran wird als "Translokation" bezeichnet.

Bei der Proteinsekretion (Ausschleusen) unterscheidet man in gram-negativen Bakterien mehrere verschiedene Typen an Sekretionssystemen. Eine grobe Einteilung erlaubt die Unterscheidung von Sec-abhängigen und Sec-unabhängigen Systemen. Die Sec-abhängige Proteintranslokation ist bei Weitem die häufigste Weise auf die Prä-Proteine durch die bakterielle Zytoplasmamembran geschleust werden (Driessen *et al.*, 1998; Hueck, 1998).

Als Sec-abhängig sind die sogenannten Typ II- und Typ V-Sekretionssysteme einzustufen. Beim Typ II-Sekretionssystem (Sandkvist, 2001), werden die zu translozierende Proteine an die Cytoplasmamembran hingeführt und dann mittels der Sec-Maschinerie (ca. 12 Proteine) transloziert, prozessiert und schließlich sekretiert. Unter dem Typ V-Sekretionssystem befinden sich (bei Gram-negativen Bakterien) Autotransporter mit selbstprozessierender Protease (Henderson *et al.*, 1998).

Als Sec-unabhängige Sekretionssysteme sind die Typ I-, Typ III- und Typ IV-Systeme bekannt. Zu Typ I (Andersen, 2003; Binet *et al.*, 1997) gehören ABC-Transporter, bei denen das Protein in einem Schritt durch die zytoplasmatische- und äußere Membran transportiert wird. Das Typ III-Sekretionssystem (Yik & Strynadka, 2006) wird auch als Kontakt-abhängige Sekretion bezeichnet. Hierbei erfolgt die eigentliche Translokation über die Ausbildung eines Pilus-ähnlichen Sekretionsapparates der sowohl zytoplasmatische-, sowie äußere und letztlich auch die Wirtszell-Membran durchspannt. Beim Typ IV-System (Burns, 2003; Christie, 2001; Fischer *et al.*, 2002) handelt es sich um die Ausbildung eines Konjugations-ähnlichen Pilusapparates der die Bakterienzelle mit der Wirtszelle verbindet. Durch diese Konjugationsbrücke können sowohl einzelsträngige DNA (wie z.B. Ti-Plasmid bei *Agrobacterium tumefaciens*) als auch Proteine (z.B. *Bordetella pertussis* Toxin) vom Bakterium in die Wirtszelle übertragen werden.

1.4.3 Transportproteine, eine Klasse neuartiger Virulenzfaktoren?

Wie erwähnt haben Tier- und Pflanzenpathogene Bakterien eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um ihre Wirtsorganismen zu infizieren. Hierbei spielen bakterielle Sekretionssysteme eine wichtige Rolle. Im Falle von *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* ist besonders das Typ II-Sekretionssystem, das die Sekretion der CWDEs ermöglicht,

hervorzuheben. Als Virulenzfaktor kann gemeinhin jegliche Struktur bezeichnet werden, die durch ein Pathogen synthetisiert wird und essentiell für das Auslösen einer Krankheit in einem Wirt ist. Bisher gibt es zahlreiche Vorschläge was genau als Virulenzfaktor bezeichnet werden kann (Domingue & Woody, 1997; Finley & Falkow, 1997). Nach Wassenaar & Gaastra (Wassenaar & Gaastra, 2001), können Virulenzfaktoren grob in drei Klassen eingeteilt werden. Demnach zählen die weiter oben ausführlicher behandelten CWDEs zu den primären also wahren Virulenzfaktoren. Die globalen oder spezifischen Regulatoren dieser primären Klasse werden als sekundäre Virulenzfaktoren bezeichnet. Die Bedeutung von Proteinen für die Virulenz und somit die Berechtigung einer Klassifizierung als Virulenzfaktor, ist also durchaus komplex. Weiterhin ist ein Typ III-Sekretionssystem, welches Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert und diese dann zum Vorteil des Pathogens modifiziert, essenziell für die Pathogenität vieler Gram-negativer Bakterien. Allerdings ist dieses Typ III-System nicht nur für die bakterielle Pathogenität verantwortlich, sondern spielt auch bei der Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen eine Rolle (Viprey *et al.*, 1998).

Neuere Studien belegen, dass neben diesen Sekretionssystemen auch die weiter oben beschriebenen Transportproteine selbst eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Pathogenese spielen. Solche Proteine, die für die Kolonialisierung von Geweben durch Pathogene und deren weiteres Wachstum unerlässlich sind müssen demnach auch in die oben vorgestellte Klassifizierung integriert werden (Wassenaar & Gaastra, 2001). Dementsprechend ist eine Einordnung von manchen Transportern als tertiäre Virulenzfaktoren analog zu den oben bereits erwähnten primären und sekundären Faktoren durchaus vertretbar. Ebenso ist jedoch klar, dass eine Differenzierung zwischen „House-keeping“ Genen und solchen die als tertiäre Virulenzfaktoren eingeordnet werden können, sehr problematisch ist. Ein Haupt-Unterscheidungskriterium in dieser Grauzone ist allerdings, dass tertiäre Virulenzgene eine erhöhte Expression bei Befall von Pflanzengewebe aufweisen sollten. In der Tat konnte zum Beispiel mit Hilfe von „Microarray“-Analysen festgestellt werden, dass bei Infektion von Pflanzen mit *Erwinia chrysanthemi* aber auch beim Befall von Birnengewebe durch *Erwinia amylovora* die Expression verschiedener Gene differenziell reguliert wird (Okinaka *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005). Zu den stärker exprimierten Genen zählen neben noch unbekannten auch Gene die unter anderem für Proteasen, Resistenz- und Transport-Proteine kodieren. Verschiedene Hinweise indizierten, dass Transportproteinen in *Erwinia* eine besondere Bedeutung für die Virulenz zukommt. So besitzt zum Beispiel *E. rhapontici* die Fähigkeit, nach dem Befall pflanzlicher Gewebe die dort vorhandene Saccharose in Palatinose (ein für die Pflanze nicht metabolisierbares Kohlenhydrat) umzuwandeln und die Untereinheiten eines ABC-Typ-Palatinoseimporters werden durch die Präsenz von Palatinose exprimiert (Börnke *et al.*,

2001). Eine weitere „Array-Analyse“ von *E. chrysanthemi* belegt, dass Transkripte von bestimmten Genen die für Transporter und Permeasen kodieren, nach Befall von Pflanzengewebe sehr spezifisch akkumulieren (Okinaka *et al.* 2002). Schließlich bewirkt die „knock-out“-Mutation eines Oligosaccharid-Transporters in *E. chrysanthemi* eine deutlich verringerte Virulenz (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 2001).

1.5 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr

Bevor pflanzliche Abwehrreaktionen gegen ein spezifisches Pathogen durchgeführt werden muss dieses erst von der Pflanze erkannt werden. Nach Hahlbrock & Scheel (1987), setzt die Erkennung eines Pathogens immer das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors voraus. Als Erkennungsmerkmale dienen hierbei Elizitoren (Ebel & Cosio, 1994). Diese Substanzen die pflanzliche Abwehrreaktionen induzieren, können wiederum in zwei Gruppen unterteilt werden: Exogene also pathogenspezifische Elizitoren einerseits und endogene, pflanzliche Substanzen andererseits.

Ist ein Phytopathogen in der Lage eine Pflanze zu befallen, wird die Pflanze zu einer Wirtspflanze für das Pathogen und es liegt eine kompatible Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen vor. Die Mehrzahl der Mikroorganismen ist jedoch nicht in der Lage eine bestimmte Pflanze zu befallen, da diese entweder keinen geeigneten Wirt darstellt oder aber die Mikroorganismen nicht in der Lage sind die konstitutiven und induzierten Abwehrmechanismen der Pflanze zu überwinden. In diesem Falle liegt eine inkompatible Reaktion aufgrund der Nichtwirtsresistenz zwischen Pflanze und Pathogen vor (Heath, 2000).

Bei einer inkompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen kann weiterhin zwischen der horizontalen und der vertikalen Resistenz unterschieden werden (Agrios, 1997). In einer gegebenen Pathogen-Wirt-Beziehung wird von horizontaler Resistenz (Widerstandsfähigkeit) gesprochen, wenn ein gegebener Genotyp der Pflanze gegen alle Genotypen des Pathogens (Rassen, Stämme) in einem ähnlichen Grad resistent ist. Oft kommt es jedoch vor, dass ein gegebener Genotyp der Pflanze gegen einige Rassen des Pathogens völlig resistent ist, gegen andere dagegen völlig anfällig. Diese Form von Resistenz wird als vertikale Resistenz oder Wirtsresistenz bezeichnet (Heath, 2000; Rauscher, 2001) und beruht auf der so genannten Gen-für-Gen-Beziehung (Flor, 1971; Boch 1998; Yu, 1998).

Nach dem Überwinden der natürlichen pflanzlichen Abwehrmechanismen, beispielsweise strukturellen Barrieren (kutikuläre Wachsschichten), aber auch chemischen Substanzen (vor allem antibiotisch wirkenden Intermediaten des Sekundärstoffwechsels), gelangen Pathogene in die Pflanze. Werden sie hier erkannt, wird eine zeitlich und räumlich definierte Abwehr eingeleitet, welche auf einer Reihe von komplexen Stoffwechselreaktionen

beruhen, die wiederum Produkte bereitstellen, die den Erreger schädigen und/oder seine Ausbreitung in der Pflanze verhindern. Dieser Vorgang wird als induzierte Resistenz bezeichnet (Scheel, 1992; Somssich & Hahlbrock, 1998).

Bei der Pflanze kann bezüglich der Pathogenabwehr zwischen zwei Antworten unterschieden werden. Die eine besteht in der schnellen lokalen Genaktivierung, die zur so genannten hypersensitiven Reaktion führt. Bei dieser Reaktion, dem „Oxidative burst“, werden reaktive Sauerstoffspezies (vor allem H_2O_2) gebildet, die sowohl eine antimikrobielle als auch eine Signalfunktion haben (Peng & Kuc, 1992; Lamb & Dixon, 1997; Scheel, 1998). Das daraus folgende lokale Absterben von Pflanzenzellen durch den programmierten Zelltod verhindert eine weitere Ausbreitung des Pathogens oder führt zumindest zu einer Dezimierung oder Wachstumshemmung. Zu den lokalen und schnellen pflanzlichen Reaktionen auf Pathogenbefall zählen weiterhin die Verstärkung der Zellwand (um das weitere Eindringen der Pathogene zu erschweren) (Dixon *et al.*, 1994; Vance *et al.*, 1980), die Akkumulation Hydroxyprolinreicher Glycoproteine (Mazau & Esquerré-Tugayé, 1986), sowie die Einlagerung von Kallose (Bonhoff *et al.*, 1987) und phenolischer Komponenten (Hunter, 1974). Des Weiteren kann eine Induktion verschiedener Gene beobachtet werden, deren Genprodukte unter dem Sammelbegriff PR-Proteine (Pathogenesis related Proteins) zusammengefasst sind (Scheel, 1991; Somssich & Hahlbrock, 1998; Kombrink & Somssich, 1997; Van Loon & Van Strien, 1999). Zu den PR-Proteinen, die bei Pathogenbefall systemisch induziert werden, gehören Chitinasen, β -1,3-Glucanasen und Lysozyme (Boller, 1987), welche in der Lage sind, die Zellwandpolymere der Pathogene anzugreifen. Daneben werden Inhibitoren mikrobieller Enzyme (Bishop *et al.*, 1981) und Lektine (Sequeira, 1978) zur Agglutination von Zellen synthetisiert. Eine weitere biochemische Veränderung unter Pathogeneinwirkung stellt die Biosynthese und Akkumulation von Phytoalexinen dar, bei welchen es sich um sekundäre Metabolite handelt, die auf Bakterien und Pilze toxisch wirken (Darvill & Albersheim, 1984).

Alle bisher beschriebenen Vorgänge sind Teil einer lokalen Reaktion die deshalb auch als lokal erworbene Resistenz (Local Acquired Resistance, LAR) bezeichnet wird. Dem gegenüber steht die systemisch erworbene Resistenz (Systemic Acquired Resistance, SAR), welche nicht auf den Infektionsort beschränkt ist, sondern sich systemisch auch in nicht infizierten Teilen der Pflanze entwickelt und über mehrere Wochen andauern kann (Ross, 1961; Ward *et al.*, 1991; Ukness *et al.*, 1992; Ryals *et al.*, 1996). Die Ausbildung der SAR korreliert mit einer systemischen Aktivierung zumindest eines Teils der oben beschriebenen Mechanismen einer lokalen Resistenzantwort.

Ein interessantes Phänomen, das so genannte „Priming“, steht im Zusammenhang mit der SAR. Dieser Begriff beschreibt die Fähigkeit einer pflanzlichen Zelle nach einer

“Sensibilisierung“ mit verschiedenen SAR-Induktoren die Antwort auf einen Pathogenbefall oder Verwundung zu verstärken (Conrath *et al.*, 2001).

Bei der Antwort von Pflanzen auf *Erwinia*-Befall findet lediglich die systemische Pathogenantwort der Pflanze statt, hypersensitive Reaktionen und induzierter Zelltod werden nicht ausgelöst (Klement, 1982).

1.6 Vorarbeiten

Um die Bedeutung von ATP und ATP-abhängigen Prozessen bei der Pathogenabwehr zu untersuchen wurden in vorangegangenen Versuchen in unserer Arbeitsgruppe transgene Kartoffelpflanzen erzeugt, bei denen die Aktivität des plastidären ATP/ADP-Transporters (AATP1) erhöht (NTT sense-Pflanzen) oder verringert (NTT antisense-Pflanzen) wurde (Tjaden *et al.*, 1998).

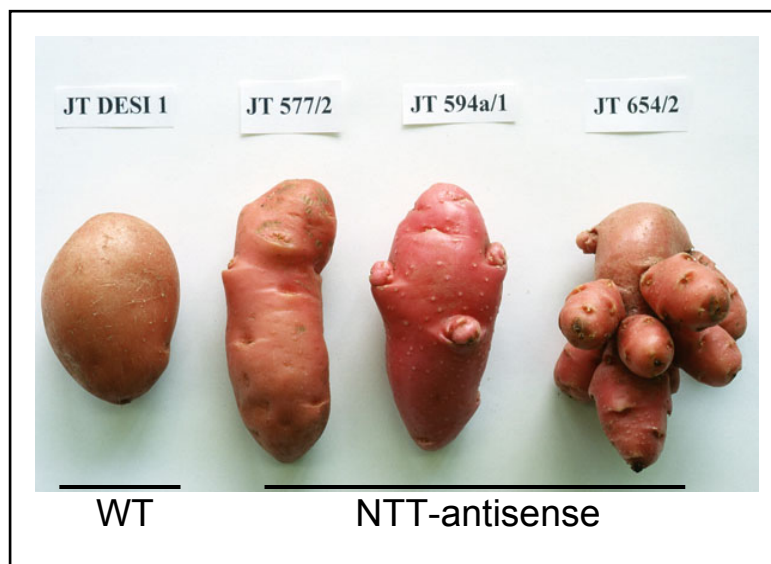


Abb. 2: Morphologischer Phänotyp der AATP1(*St*)-antisense Kartoffelknollen. Gezeigt sind sowohl Wildtyp- (WT) als auch AATP1(*St*)-antisense (NTT-antisense) Knollen. In dieser Arbeit wurde einzig mit Knollen der NTT-antisense Linie JT 654 gearbeitet (Stärkste antisense Linie).

Antisense-Pflanzen zeigten eine erwartungsgemäß um bis zu 45% verringerte Aktivität des plastidären ATP/ADP-Transporters auf. Zusätzlich kennzeichnen sich die NTT-antisense Kartoffelknollen durch eine Ingwerartige Morphologie, um bis zu 50% erniedrigte Stärkegehalte und eine bis zu zehnfach erhöhte Konzentration an reduzierenden Zuckern. Ähnlich erhöhte Konzentrationen konnten für die Saccharose- und Fruktosegehalte festgestellt werden. Auch bei Hexosephosphaten sowie Glukose-6-Phosphat liegt eine Verdoppelung der Konzentration gegenüber dem Wildtypen vor (Geigenberger *et al.*, 2001).

Durch weitere Arbeiten konnte gezeigt werden, dass besagte NTT-antisense Pflanzen eine stark erhöhte Resistenz gegen *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* aufweisen (Linke *et al.*, 2002). Auch gegenüber anderen Pathogenen wie Pilzen, Nematoden und Viren sind diese antisense Knollen resistenter (Conrath *et al.*, 2003; Reinhold, Daten nicht

veröffentlicht). Bisher konnte gezeigt werden, dass die verbesserte Widerstandskraft nicht durch eine erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies zu erklären ist. Auch eine stärkere Induktion von PR-Proteinen scheint zumindest die erhöhte Resistenz nicht hinreichend erklären zu können (Linke, 2003). Einzig und allein ein „Priming-Effekt“ beruhend auf einem bisher nicht identifizierten mobilen Signal könnte die Breitband-Resistenz der NTT-antisense Pflanzen erklären.

1.7 Zielsetzung

Bisher konnte keine hinreichende Erklärung für die Breitbandresistenz von NTT-antisense-Kartoffeln gefunden werden. Molekulare Untersuchungen an *Solanum tuberosum* gestalten sich wegen der oben beschriebenen genetischen Komplexität als sehr schwierig. Weiterhin können durch biochemische Untersuchungen ohne neuere molekulare Daten nur rein deskriptive Aussagen getroffen werden.

Da durch Genomsequenzierung und weitere vorhandene Analysen das bakterielle System *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* besser erforscht ist, bietet sich eine Herangehensweise über diese bakterielle Seite zur weiteren Entschlüsselung des Problems an. Zusätzlich eröffnet sich hierbei die Möglichkeit mittels Wildtyp- und NTT-antisense Kartoffeln, die bakterielle Virulenz-Physiologie näher zu untersuchen bzw. diese zu verändern und entsprechende Auswirkungen auf Virulenz bzw. Resistenz zu beobachten.

- Zu diesem Zweck galt es ein System zu generieren, das die Erzeugung von „K.O.“-Mutanten ermöglicht. Dieses System sollte eine gezielte, sowie zuverlässige Fertigung und Identifizierung von „K.O.“-Mutanten in einfacher Weise sichern. Als potenzielle „Targets“ einer solchen Mutagenese sollten bevorzugt für Transportproteine kodierende Sequenzen berücksichtigt werden.
- Des Weiteren sollten die erzeugten Mutanten hinsichtlich ihrer Virulenz mittels Knollenscheibchentests überprüft werden. Hierbei sollten vor allem spezifische Unterschiede zwischen Wildtyp- und NTT-antisense Knollen genauer untersucht werden. Diese sollten dann sowohl hinsichtlich des bakteriellen Metabolismus betrachtet, als auch in das Stoffwechselgeflecht zwischen Wildtyp- bzw. NTT-antisense Knollen und Pathogen integriert werden.
- Die vorhandenen molekularen als auch phytopathologischen Daten der erzeugten Mutanten sollten weiterhin um eine biochemische Analyse der jeweiligen Transportproteine (Ziele der „K.O.“-Mutagenese) ergänzt werden. Dies ermöglicht die aus der Mutagenese resultierenden Eingriffe in den bakteriellen Stoffwechsel und die daraus folgenden Auswirkungen auf die Virulenz von *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* zu interpretieren

- Schlussendlich sollten die so gesammelten Daten in ein Gesamtkonzept integriert werden, welches erlaubt die bei der Pathogenese von *Eca* stattfindenden Veränderungen des Stoffwechsels als auch jener der Kartoffelknolle genauer zu verstehen. Besonders die NTT-antisense Knollen galt es in diesem Zusammenhang genauer zu überprüfen. Die so gewonnenen Ergebnisse sollten dann zur weiteren Aufklärung der beschriebenen Breitbandresistenz als auch der Identifikation des unbekannten mobilen Faktors (der dem „Priming“-Phänomen zu Grunde liegt) dienen.
- Die vorangegangenen Kernpunkte dieser Arbeit, beschäftigen sich mit der Bedeutung von Transportproteinen hinsichtlich der Virulenz von *Erwinia* sowie ihrer grundlegenden Charakterisierung. Zusätzlich sollte auch die Bedeutung solcher Proteine für *Magnaporthe grisea* näher untersucht werden. Hierzu konnte mittels enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe Thines des Institutes für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF) auf Gensequenzen zurückgegriffen werden, deren Bedeutung bereits durch eine molekulare und phytopathologische Charakterisierung untersucht wurde (AG Thines). Eine biochemische Untersuchung sollte die bereits vorhandenen Informationen über diese Proteine ergänzen und neue Einsichten in die Pathogenese von *M.grisea* ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden *Escherichia coli* und *Erwinia carotovora* Stämmen gearbeitet (Tab. 2.1). Die *E.coli*-Stämme wurden in YT-Medium (0,8% (w/v) Pepton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,25% (w/v) NaCl; pH 7,0; +1,5% (w/v) Agar für YT-Platten) bzw. LB-Medium (1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,0; +1,5% (w/v) Agar für YT-Platten) unter aeroben oder anaeroben Bedingungen bei 37°C angezogen. Die entsprechenden *Erwinia*-Stämme wurden auf *Erwinia* Minimal-Medium (0,2% (w/v) NH_4SO_4 ; 0,4% (w/v) KH_2PO_4 ; 0,6% (w/v) Na_2HPO_4 ; 0,02% (w/v) MgSO_4 ; 0,001‰ (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001‰ (w/v) CaCl_2 ; 0,1% Polygalakturonsäure; pH 6,7) sowie Minimal-Mediumplatten (+3,9% (w/v) Potato Dextrose Agar) unter aeroben oder anaeroben Bedingungen bei 28°C angezogen. Durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika wurden geeignete Selektionsmedien hergestellt (Tab. 2.2). Die zur heterologen Expression benutzten Stämme wurden unter anderem in TB-Medium (1,2% (w/v) Pepton; 2,4% (w/v) Hefe-Extrakt; 0,4% (w/v) Glycerin; mit sterilem Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 (0,017M KH_2PO_4 und 0,072M K_2HPO_4)) angezogen. Zur weiteren biochemischen Charakterisierung wurde weiterhin Simmons Citrate Medium (Simmons, 1926) benutzt, sowie M9 Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 2001) mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterien-Stämme	Resistenz	Verwendung	Referenz
<i>Escherichia coli</i>			
<i>E.coli</i> XL1 Blue	Tet ^R	Sämtliche Klonierungen	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E.coli</i> C43 (DE3)	-	Heterologe Expression	Miroux & Walker, 1996
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Clm ^R	Heterologe Expression	Studier <i>et al.</i> , 1990
<i>E.coli</i> BLR pLysS (recA ⁻)	Clm ^R , Tet ^R	Heterologe Expression	Studier <i>et al.</i> , 1990
<i>E.coli</i> BL codon-usage ⁺	Clm ^R , Tet ^R	Heterologe Expression	Stratagene, Heidelberg
<i>E.coli</i> C600-SM2	Sm ^R	Suicide-Vektor Stamm	Geider & Baldes, 1988
<i>E.coli</i> S17-1λ-pir	Sm ^R	Suicide-Vektor Stamm	Burse <i>et al.</i> , 2004
<i>Erwinia carotovora</i>			
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i> (Eca) SCRI 1043	-	Eca-Wildtyp	Gardan <i>et al.</i> , 2003
<i>Eca4218::Kan^R</i>	Kan ^R	Eca-Mutante	Diese Arbeit

Bakterien-Stämme	Resistenz	Verwendung	Referenz
<i>Eca4415::kan^R</i>	Kan ^R	<i>Eca</i> -Mutante	Diese Arbeit
<i>Eca3984::kan^R</i>	Kan ^R	<i>Eca</i> -Mutante	Diese Arbeit
<i>Eca3984::kan^R, Eca3984</i>	Kan ^R , Amp ^R	Komplementierte <i>Eca</i> -Mutante	Diese Arbeit
<i>Eca3503::kan^R</i>	Kan ^R	<i>Eca</i> -Mutante	Diese Arbeit
<i>Eca0620::kan^R</i>	Kan ^R	<i>Eca</i> -Mutante	Diese Arbeit
<i>Eca4400::kan^R</i>	Kan ^R	<i>Eca</i> -Mutante	Diese Arbeit
<i>Eca2207::kan^R</i>	Kan ^R	<i>Eca</i> -Mutante	Diese Arbeit
<i>EcaX::kan^R</i>	Kan ^R	Unbekannte <i>Eca</i> -Mutante	Diese Arbeit

Tab. 2.2: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin (Amp)	200
Chloramphenicol (Clm)	25
Kanamycin (Kan)	50
Rifampicin (Rif)	500
Streptomycin (Sm)	15
Tetracyclin (Tet)	10

2.1.2 Hefestämme, Medien und Anzuchtbedingungen

Für Komplementations- und Aufnahmestudien wurde mit folgenden *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen gearbeitet (Tab. 2.3). Die verwendeten Hefen wurden je nach Versuch und Stamm auf den in Tab. 2.4 aufgeführten Medien und Platten aerob bzw. anaerob bei 30°C angezogen. Die benutzten Selektionsmedien wurden durch Zugabe der in Tab. 2.5 aufgeführten Lösungen hergestellt.

Tab. 2.3: Verwendete *S.cerevisiae* Stämme

<i>S.cerevisiae</i> Stamm	Phänotyp	Verwendung	Referenz
JT16	Histidin-Transporter defizienter Hefe-Stamm	-	Fischer <i>et al.</i> , 2002
22Δ8AA	Defizient in der Verwertung von Arg, Asp, Citr, GABA, Glu, Pro His Lys als einzige N-Quelle	Aminosäure-Transporter Komplementation	Fischer <i>et al.</i> , 2002

<i>S.cerevisiae</i> Stamm	Phänotyp	Verwendung	Referenz
W303-1A	His ⁻ , Leu ⁻ , Trp ⁻ , Ura ⁻ , Ade ⁻	-	Ferreira <i>et al.</i> , 2005
ΔSTL1	W303-1A <i>stl1</i> :: <i>KanMX</i>	Glycerin-Transporter Komplementation	Carlsberg Laboratory (Denmark)
22Δ8AA/pDR196	Wie 22Δ8AA	Leerer pDR196 Vektor tragender 22Δ8AA Stamm	Diese Arbeit
22Δ8AA/pCUY_Rig2	MG02072 in pDR196 tragender 22Δ8AA	pCUY_Rig2 Vektor tragender 22Δ8AA Stamm	Diese Arbeit

Tab. 2.4: Verwendete *S.cerevisiae* Medien

Medium	Zusammensetzung	Verwendung
YPD Voll-Medium und Agar	1% (w/v) Hefe Extrakt 2% (w/v) Pepton 2% (w/v) Dextrose [2% (w/v) Agar]	Anzucht sämtlicher Hefestämme
YPG-Medium und Agar	1% (w/v) Hefe Extrakt 2% (w/v) Pepton 2% (w/v) Glycerin [2% (w/v) Agar]	Komplementation zur Glycerin- verwertung des ΔSTL1 Stammes
N- non selective Minimal-Medium und Agar	0,67% (w/v) Yeast-Nitrogene-Base +NH ₄ ⁺ 2% (w/v) Glucose 1x Drop Out (ohne Uracil) [2% (w/v) Agar]	Selektion und Anzucht von 22Δ8AA Transformanden
N-selective Minimal-Medium und Agar	0,17% (w/v) Yeast-Nitrogene-Base - NH ₄ ⁺ 2% (w/v) Glucose 1,5mM N-Quelle [2% (w/v) Agar]	Komplementation zur Amino- säureverwertung des 22Δ8AA Stammes

Tab. 2.5: Lösungen zur Herstellung der Selektionsmedien

Lösungen	Zusammensetzung	Endkonzentration
Glucose	20% (w/v) Glucose	2%
Prolin	15mM Prolin	1,5mM
Histidin	15mM Histidin	1,5mM
Betain	15mM Betain	1,5mM
10fach Drop Out Aminosäure-Basen Mix	jeweils 0,01% (w/v); Adenine Arginin Cystein Leucin Lysin Threonin Tryptophan Tyrosin Valin jeweils 0,005% (w/v) Aspartat Histidin Isoleucin Methionin Phenylalanin Prolin Serin	1fach

2.1.3 Vektoren und Konstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Konstrukte, die zur Klonierung, Expression oder Komplementation in Bakterien und Hefen eingesetzt wurden, sind in Tab. 2.6 dargestellt.

Tab. 2.6: Auflistung der verwendeten Vektoren

Plasmide	relevante Merkmale	Referenz
pBSK	Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pUC18	Klonierungsvektor	Fermentas, St.Leon-Rot
pUCKan	KanR-tragender pUC18-Vektor	Amoroso <i>et al.</i> , 2003
pUCKan(-EcoRI)	pUCKan Δ EcoRI450	Diese Arbeit
pSM	SmR-tragender pUC18-Vektor	Diese Arbeit
pET16b	Expressionsvektor mit N-term. Histidin-„Tag“	Novagen, Heidelberg
pET21a	Expressionsvektor mit C-term. Histidin-„Tag“	Novagen, Heidelberg
pET42a	Multi-„Tag“-Expressionsvektor	Novagen, Heidelberg

Plasmide	relevante Merkmale	Referenz
pEco	Suicide-Vektor (pUC18, 2·EcoRI)	Diese Arbeit
pCAM-140	Promotorloser GUS-Fusionsvektor (Mini-TN5 Kasette)	Burse <i>et al.</i> , 2004
pCAM-MCS	Suicide-Vektor	Burse <i>et al.</i> , 2004
pKO3	Suicide-Vektor	Link <i>et al.</i> , 1997
pdf-3	Suicide-Vektor	Geider & Baldes, 1988
pUH89	Klonierungsvektor	Henrich & Schmidtberger, 1995
pGFP-2	Pflanzen GFP-Fusionsvektor	Wendt <i>et al.</i> , 2000
pGFP-MCS	Promotorloser pGFP-2 Vektor mit artifizieller pBSK MCS	Diese Arbeit
pCU22	<i>Eca4218</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU22.1	<i>Eca4218::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU23	<i>Eca4218</i> in pET16b	Diese Arbeit
pCU24	<i>Eca4415</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU24.1	<i>Eca4415::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU26	<i>Eca4415</i> in pET21a	Diese Arbeit
pCU28	<i>Eca0620</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU28.1	<i>Eca0620::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU29	<i>Eca4400</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU29.1	<i>Eca4400::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU33	<i>Eca3984</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU33.1	<i>Eca3984::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU35	<i>Eca3984</i> in pET16b	Diese Arbeit
pCU37	<i>Eca1287</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU37.1	<i>Eca1287::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit

Plasmide	relevante Merkmale	Referenz
pCU38	<i>Eca2207</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU38.1	<i>Eca2207::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU45.1	<i>Eca3984</i> + Promotor-Region in pBSK	Diese Arbeit
pCU47	<i>Eca3503</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU47.1	<i>Eca3503::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU48	<i>XanCP_Q8P517</i> in pEco	Diese Arbeit
pCU48.1	<i>XanCP_Q8P517::Kan^R</i> in pEco	Diese Arbeit
pDR196	Hefe- <i>E.coli</i> „Schuttle“-Expressionsvektor	Rentsch <i>et al.</i> , 1995
p426MET25	Hefe- <i>E.coli</i> „Schuttle“-Expressionsvektor	Mumberg, Müller & Funk, 1994
pCU_rig2	MG02072 in pBSK	Diese Arbeit
pCU_rig3	MG09852 in pBSK	Diese Arbeit
pCUY_rig2	MG02072 in pDR196	Diese Arbeit

2.1.4 Oligonukleotide

Die für die DNA-Sequenzanalyse, sowie für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzten Oligonukleotide, die von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt wurden, sind im Anhang I dieser Arbeit aufgelistet.

2.1.5 Rekombinante Techniken

2.1.5.1 Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen

Bei *E.coli* lässt sich die Aufnahmebereitschaft fremder DNA, die sog. Kompetenz, durch Behandlung der Zellen mit eiskalter Rubidiumchlorid-haltiger Lösung induzieren (Hanahan, 1983). Nach dieser Methode hergestellte kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt, bis zu 30 Minuten auf Eis inkubiert und

anschließend einem Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C ausgesetzt. Zum Abkühlen wurden die transformierten Zellen kurz auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Zellen in nichtselektivem ψ B-Medium (0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) MgSO_4 ; 0,5% (w/v) KCl, pH 7,6 KOH) für 1-2 Stunden bei 37°C aerob angezogen. Zur Selektion wurden die transformierten *E.coli*-Zellen auf Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Eine weitere Methode zur Transformation von *E.-coli*-Zellen stellt die Elektroporation dar (Sambrook *et al.*, 2001). Bei der Elektroporation werden die Bakterienzellen in Gegenwart der einzubringenden DNA einem kurzen elektrischen Puls ausgesetzt. Dadurch werden in der Zellmembran Poren erzeugt, durch die die DNA in die Zelle gelangen kann.

Hierzu wurden jeweils 40 μ l-Aliquots gewaschene und in 10%igem Glycerin gelagerte *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA versetzt und in einem „*E.-coli*-Pulser“ der Firma Biorad (München) einer Spannung von 2,5kV und einem Stromimpuls von ca. 9ms ausgesetzt. Nach der Elektroporation wurden die transformierten Bakterienzellen im ψ B-Medium für eine Stunde bei 37°C angezogen. Abschließend erfolgte die Selektion der Transformanten unter den jeweiligen Selektionsbedingungen.

2.1.5.2 Herstellung und Transformation von kompetenten *S.cerevisiae* Zellen

Die Herstellung hitzekompetenter *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen erfolgte, indem mittels einer über Nacht angezogenen Vorkultur des respektiven Hefestammes 50ml YPD-Medium auf eine OD_{600} von ca. 0,1 eingestellt wurde. Diese wiederum wurde bei einer OD_{600} von 0,6 durch Zentrifugation (3000g, 5min bei 4°C) geerntet, anschließend mit 25ml sterilem Wasser gewaschen und in 1ml 100mM Lithiumacetat resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen wieder pelletiert (13000 g, 15sec, 4°C) und 500 μ l des Überstandes entfernt. Nach dem Resuspendieren wurden die Zellen in 50 μ l Aliquots aufgeteilt und pelletiert (13000 g, 15sec, 4°C). Das Zellpellet konnte nun direkt zur Transformation durch Zugabe von 240 μ l PEG, 35 μ l 1M Lithiumacetat, 50 μ l ss-Heringssperma-DNA (2mg/ml), der zu transformierenden Plasmid-DNA und dem entsprechenden Volumen an H_2O (steril), um 500 μ l Gesamtvolumen zu erreichen, eingesetzt werden. Um das Pellet zu lösen wurde der komplette Ansatz nun vorsichtig geschüttelt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Daraufhin folgte ein Hitzeschock für wiederum 30 Minuten bei 42°C im Wasserbad. Abschließend wurden die Zellen kurz zentrifugiert (13000 g, 15sec, 4°C), in 200 μ l sterilem H_2O aufgenommen und auf entsprechenden Agar-Platten (Tab. 2.5) ausplattiert.

2.1.5.3 Herstellung und Transformation von kompetenten *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* Zellen

Die Transformation von *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* bedingt einige Abwandlungen der für *E.coli* bekannten und gebräuchlichen Methoden. Die in dieser Arbeit praktizierte Transformation und Herstellung von kompetenten Erwinien beruht zu großen Teilen auf der Methode von Sambrook *et al.*, 2001. Zur Einbringung von DNA-Molekülen wurde einzig und allein die Elektroporation durchgeführt. Hierzu wurden 100µl-Aliquots gewaschene und in 10% Glycerin aufkonzentrierte Zellen mit bis zu 2µg Plasmid-DNA versetzt und in einem „*E.-coli*-Pulser“ der Firma Biorad (München) einer Spannung von 2,5kV und einem Stromimpuls von ca. 9ms ausgesetzt. Nach der Elektroporation wurden die transformierten Bakterienzellen in 1ml ψB-Medium für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend unter den jeweiligen Selektionsbedingungen ausplattiert.

2.1.5.4 „*In-vitro*“-Manipulation von DNA

Zu der *In-vitro*-Manipulation von DNA gehören das gezielte Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen, sowie alle weiteren Modifikationen von DNA-Molekülen mittels rekombinanten Enzymen wie z.B. Zusammenfügen einzelner DNA-Fragmente durch DNA-Ligasen, Phosphorylierung durch Kinasen oder auch Dephosphorylierung durch Phosphatasen.

- Restriktion: Doppelsträngige DNA-Sequenzen können mittels Restriktionsendonukleasen an palindromen Erkennungssequenzen geschnitten werden. Die Modifikation von DNA-Molekülen erfolgte nach Angaben des korrespondierenden Herstellers der Enzyme (Fermentas, St.Leon-Rot; NEB, Schwalbach). Bei der Restriktion von Mini-Plasmid-isolierter DNA wurde jedoch RNase (Diagonal, Münster) zugefügt.
- Phosphorylierung: Das Hinzufügen von Phosphatresten an 5'-OH Gruppen von DNA-Molekülen erfolgte mittels Polynukleotid-Kinase in A-Puffer von Fermentas (St.Leon-Rot), nach Angaben des Herstellers.
- Fill-in Reaktionen: Zum Eliminieren von ungewünschten Schnittstellen oder zum „Glätten“ von „Sticky ends“ nach Restriktionsreaktionen wurde mit dem von Fermentas (St.Leon-Rot) angebotenen Klenow Enzym nach Angaben des Herstellers gearbeitet.
- Oligo-Klonierung: Um längere, artifizielle Insertionen in vorhandene DNA-Sequenzen einzufügen wurden korrespondierende Oligo-Nukleotide der Firma MWG (Ebersberg)

verwendet. Passende Paare wurden dann in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben, für eine Minute bei 100°C aufgekocht und dann bei Raumtemperatur auf der Laborbank inkubiert. Hierbei lagern sich die jeweils passenden einzelsträngigen Oligo-Nukleotiden an und bilden somit ein doppelsträngiges DNA-Molekül, welches zur weiteren Klonierung benutzt werden kann.

- Ligation: Zur Herstellung von rekombinanten DNA-Molekülen wurden kompatible kohäsive Enden von Vektor- und Ziel-DNA, mittels T4-DNA-Ligase (Fermentas, St.Leon-Rot) verknüpft. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.
- Ortsgerichtete Mutagenese: Diese Technik erlaubt es mittels ausgewählter Oligo DNA-Molekülen zahlreiche Veränderungen an bestehenden DNA-Sequenzen vorzunehmen. Hierzu wird mittels eines korrespondierenden Primerpaares, welches die gewünschten Sequenzveränderungen enthält, eine PCR-Reaktion auf das zu verändernde DNA-Molekül durchgeführt. Die Basen- und Codon-Austausche, Insertionen oder Deletionen als auch weitere Veränderungen sind dann in den aus der PCR hervorgegangenen, neu amplifizierten Molekülen vorhanden. Diese können dann von den nicht erwünschten Elternmolekülen mittels DpnI-Verdau getrennt werden, da in dieser Reaktion die methylierten Elternmoleküle durch Restriktion abgebaut und die durch PCR neu entstandenen, nicht-methylierten intakt gelassen werden. Die PCR-Reaktionen wurden wie in 2.1.5.5. beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass längere Extensionszeiten und eine höhere Konzentration an dNTPs gewählt wurde.

2.1.5.5 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) können auch geringste Mengen an DNA amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1987). Das Prinzip dieser Vervielfältigungstechnik ist die wiederholte Synthese spezifischer DNA-Sequenzen, wobei jeder Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligonukleotidprimer und Synthese der komplementären DNA-Stränge besteht. Hierbei wurde mit Oligonukleotiden der Firma MWG (Ebersberg) und den selbst produzierten Pfu- und Taq-Polymerasen nach Desai & Pfaffle (1995), gearbeitet. Die Reaktionen wurden in einem T3-Thermocycler, einem PTC100-Block sowie einem T-Gradienten Gerät durchgeführt (Biometra, Göttingen).

2.1.5.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Molekularbiologische Arbeiten wie z.B. DNA-Sequenzierungen, Restriktionsanalysen, Ligationen usw. erfordern die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen. Die Plasmid-

Isolierung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979), und den unterschiedlichen Präzipitationseigenschaften von Plasmid-DNA, chromosomaler Wirts-DNA, Proteinen, sowie RNA lysierter Bakterienzellen (Sambrook *et al.*, 2001).

Je nach benötigter Plasmidmenge und -reinheit wurden verschiedene Variationen von Plasmid-Isolierungen durchgeführt. Für die meisten Klonierungen wurde auf die Methode nach Sambrook *et al.*, 2001 zurückgegriffen. Um besonders reine DNA für Sequenzanalysen, PCR und DNA-Sonden zu erhalten, wurde mit dem „QuickSpin Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Hierbei führt ein zusätzlicher säulenchromatographischer Schritt zu einer erhöhten Reinheit der Plasmid-DNA.

2.1.5.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Für die Plasmid-DNA-Isolierung aus Hefe-Zellen wurden 3ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und in 100µl STET-Puffer (50mM Tris-HCl, 50mM Na-EDTA, 8% (w/v) Saccharose, 5% (w/v) Triton 100, pH 8,0) resuspendiert. Ein Aufbrechen der Hefezellen erfolgte durch die Zugabe von 0,2g Glasperlen und 3-5minütiges Vortexen. Nach Zugabe von weiteren 100µl STET-Puffer und kurzem Mischen wurde der Ansatz für drei Minuten bei 100°C inkubiert. Nach dem Abkühlen sowie Zentrifugation (10min, 18.000 g, 4°C) wurden 100µl des Überstandes in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 50µl Ammoniumacetat (7,5M), und einer einstündigen Inkubation bei –20°C wurden nach Zentrifugation 100µl des Plasmid-DNA-Ammoniumacetat-Gemisches in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 100% Ethanol und einer 30 minütigen Inkubation bei –70°C gefällt und das erhaltene DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen unter der Sterilbank wurde das Pellet dann in 20µl H₂O aufgenommen. Da die Ausbeute an Plasmid-DNA bei dieser Methode relativ gering ist, muss eine Retransformation in XL1blue-*E.coli*-Zellen vorgenommen werden.

2.1.5.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Größenfeststellung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 2001). Diese wurde bei konstanter Spannung (80-120mV) in horizontalen Gelapparaturen und in einfach konzentriertem TAE-Laufpuffermedium durchgeführt. Abhängig von der zu trennenden Größe der Moleküle wurden 0,8-1,5%ige Agarosegele hergestellt. Die Auftrennung von RNA erfolgte in formaldehydhaltigen Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 2001). Zur Markierung der Lauffront wurden die Proben mit fünffach-TAE-Ladepuffermedium B versetzt, bzw. fünffach-TAE-Ladepuffermedium O bei erwarteten Produktgrößen kleiner 1100 Basenpaaren.

Als Größenstandard diente der Lambda DNA/*Pst*I Marker (Fermentas, St.Leon-Rot). Nach der Auftrennung wurden die Nukleinsäuren unter UV-Licht ($\lambda = 230\text{nm}$) durch die Einlagerung von Ethidiumbromid ($0,5\mu\text{g/ml}$) sichtbar gemacht und ausgewertet.

Tab. 2.7: Zusammensetzung der verwendeten Ladepuffermedien

Puffermedium	Zusammensetzung
fünffach Ladepuffermedium B	50% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau in 5xTAE-Puffermedium
fünffach Ladepuffermedium O	50% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Orange G in 5xTAE-Puffermedium

2.1.5.9 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente durch Elektrophorese wurden diese mit Hilfe des QuickElute Extraction Kit, (Macherey & Nagel, Düren) aus dem Agarosegel extrahiert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der selektiven Adsorption von DNA an Silikat-Partikel in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Die Proteine, Salze, Agarose und das Ethidiumbromid werden durch mehrere Waschschrte von der gebundenen DNA getrennt. Die Menge extrahierter DNA konnte anschließend photometrisch bestimmt werden.

2.1.5.10 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch die Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch ermittelt, wobei eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von $50\mu\text{g}$ doppelsträngiger DNA/ml bzw. $40\mu\text{g}$ RNA/ml entspricht (Sambrook *et al.*, 2001). Dazu wurde ein Aliquot in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt und die Absorption in speziellen Kunststoffküvetten (Eppendorf, Hamburg) im Photometer (Eppendorf Bio-Photometer, Hamburg) gemessen. Die DNA-Konzentration wurde des Weiteren auch mit Hilfe eines NanoDrop Gerätes (PeqLab, Erlangen) photometrisch bestimmt. Dieses Gerät hat den Vorteil das nur geringe Probevolumina von Nöten sind, um sehr genaue Bestimmungen der jeweiligen Konzentration zu erhalten.

2.1.5.11 Herstellung eines Systems zur gezielten „Knock-out“-Mutagenese in *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* und Identifizierung von Mutanten

Zur Mutagenese von *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* ist ein Vektorsystem notwendig, welches bis zu einem bestimmten Zeitpunkt ohne weiteres in einem bakteriellen Klonierungsstamm replizieren kann, später jedoch im Zielorganismus nicht mehr repliziert. Solche Plasmide werden gemein hin als „suicide“-Vektoren bezeichnet. Die vorwiegend verwendeten Systeme basieren entweder auf molekularen Schaltern wie z.B. pKO3 (Link *et al.*; 1997) oder auf Bakteriophagen Replikationsursprüngen (Burse *et al.*, 2004 a, b; Geider *et al.*, 1985; Metzger *et al.*, 1992). Besonders der zweiten Gruppe an Vektoren ist gemein, dass sie zur Aufrechterhaltung des eigentlichen „K.O“-Konstruktes einen speziellen Klonierungsstamm erfordern. Das beschriebene pKO3 System welches in unserer Arbeitsgruppe vorhanden war, entsprach nicht den Anforderungen zur Herstellung gezielter Mutanten. Dies war vor allem darauf zurückzuführen, dass dieses System auf einer Temperaturselektion basiert, welche als der molekulare Schalter einer „K.O“-Mutagenese bei gram-negativen Bakterien dient. Hierbei erfordert diese Selektion Schritte, welche eine Temperatur von 42°C bedingen, Bedingungen unter denen *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* zu keinem Wachstum befähigt ist.

Im Gegensatz zu diesen Systemen stellt das in dieser Arbeit entwickelte System einen Vektor bereit der in dem weit verbreiteten *E.coli* Laborstamm XL1-Blue replizieren kann. Dieser Vektor welcher dem „K.O“-Konstrukt entspricht, kann jedoch durch geringen Aufwand zu einem beliebigen Zeitpunkt in den erforderlichen „suicide“-Vektor umgewandelt werden. Weiterhin sollte dieses System sowohl bei 30°C als auch bei 37°C funktionell sein, um damit den Wachstumsbedingungen von *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* zu genügen. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher pUC18 Klonierungsvektor (Fermentas, St. Leon-Rot) als Grundgerüst verwendet. Dieses Plasmid wurde einer ortsgerichteten Mutagenese (Kap. 2.1.5.4) unterzogen in deren Verlauf eine zusätzliche *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde. Mittels beider im Vektor vorhandenen *EcoRI*-Schnittstellen ist es nun möglich, das als pEco bezeichnete Plasmid zu einem beliebigen Zeitpunkt in einen „suicide“-Vektor umzuwandeln. Hierbei erfolgen durch die Restriktion mit *EcoRI* zwei Schnitte im Plasmid, zum einem an der *EcoRI*-Schnittstelle in der als „multiple cloning site“ bezeichneten Region, und zum anderen an der zweiten nachträglich eingefügten. Dabei flankieren diese *EcoRI*-Schnittstellen den Replikationsursprung des Plasmids, welcher hierdurch gezielt eliminiert wird (Abb. 3). Dieser Replikationsursprung ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung und Replikation des Plasmides im Bakterium. Wird durch Religation des verbleibenden Vektor-„backbone“ nun wiederum ein zirkuläres DNA-Molekül erzeugt, welches jedoch nicht mehr in Bakterien repliziert, kann durch vorhandene homologe

Sequenzen prinzipiell eine Integration in das bakterielle Genom erreicht werden. Bei Transformation von *Eca* mit der eingesetzten linearen DNA konnten keine Transformanden und somit keine putativen Mutanten erzeugt werden, da die entsprechende DNA höchstwahrscheinlich durch die Bakterien zerstört wurde (Daten nicht gezeigt).

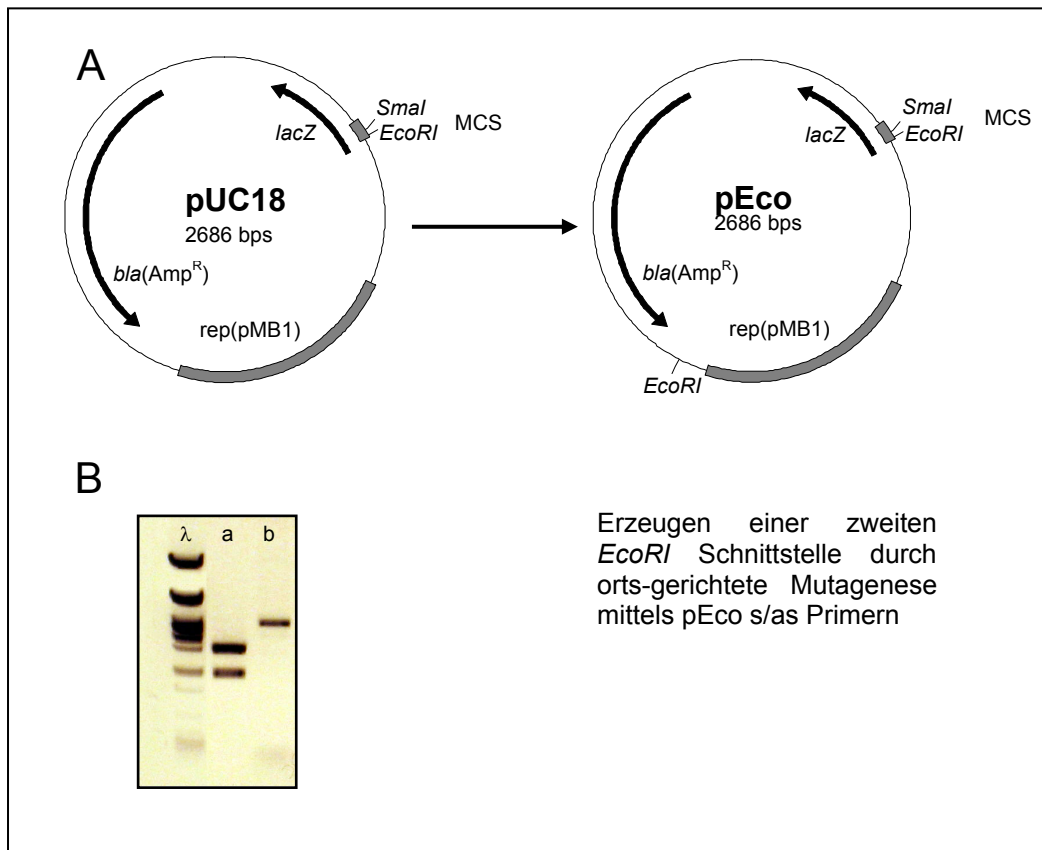


Abb. 3: Herstellung des als pEco bezeichneten Vektors. A) Einfügen einer zweiten *EcoRI*-Schnittstelle mittels ortsgerichteter Mutagenese. Angegeben sind relevante molekulare Marker sowie entsprechende Restriktionsschnittstellen (bla = beta-Lactamase; rep(pMB1) = Replikationsursprung; MCS = multiple cloning site. **B)** *EcoRI*-Restriktion des pEco- bzw. pUC18-Vektors a) pEco; Eliminierung des Replikationsursprungs, b) pUC18; Linearisierung des Plasmids.

Zur Integration ins bakterielle Genom durch homologe Rekombination ist ein zur Zielsequenz ähnlicher DNA-Bereich notwendig. Über diesen Bereich wird dann der Austausch der intakten genomischen Gen-Kopie und des unterbrochenen vektoriiellen Sequenzabschnittes vorgenommen. Die verwendeten „Target“-Sequenzen zur Herstellung entsprechender „K.O.“-Mutanten sind dem Anhang II zu entnehmen. Zur Mutagenese wurden jeweils die komplett kodierenden DNA-Bereiche der Zielgene verwendet. Um die Expression dieser Sequenz vollständig zu unterdrücken, sollten mittels des als „Kassetten-Mutagenese“ bezeichneten Verfahrens die oben beschriebenen Sequenzen durch einen

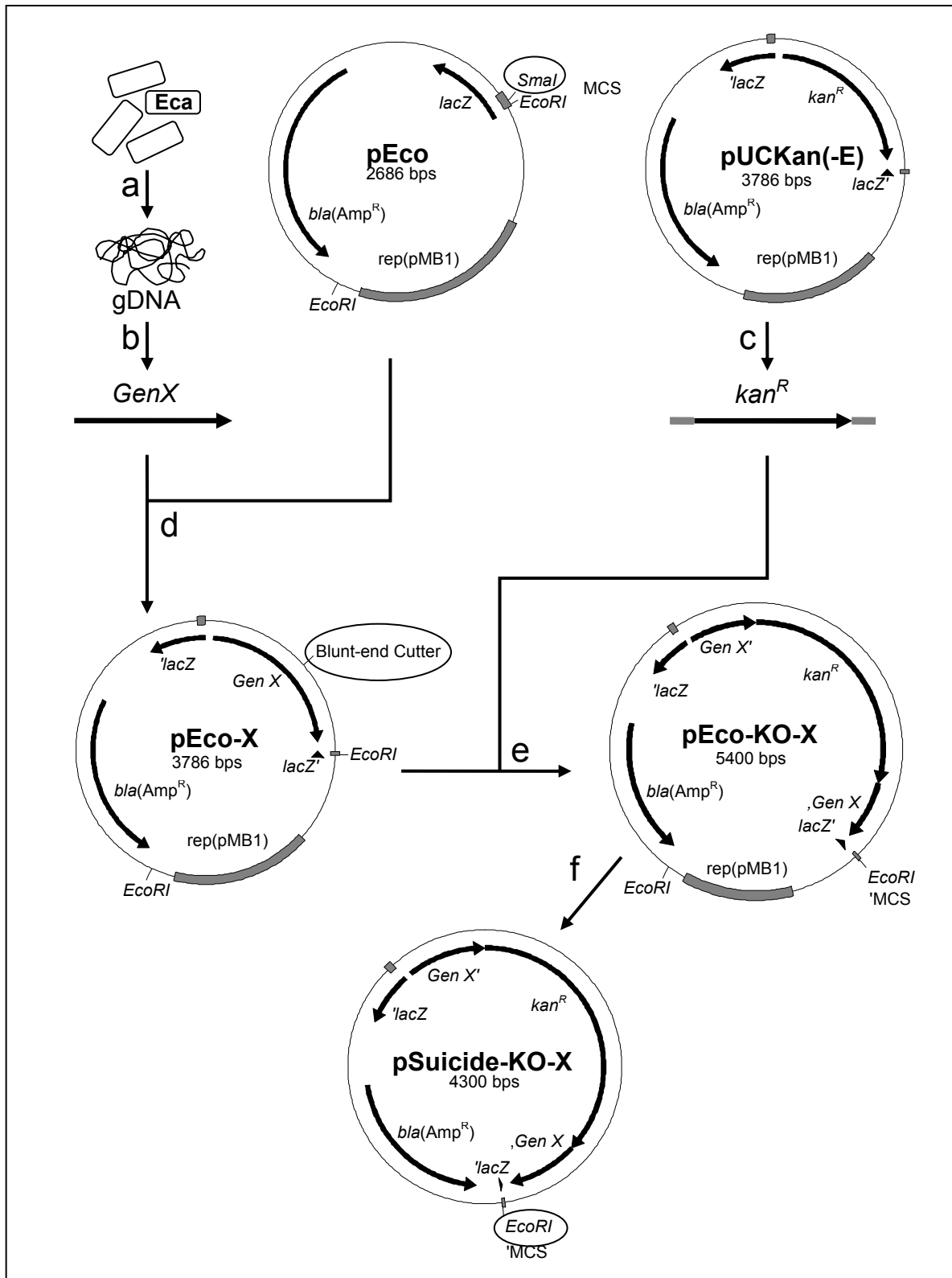


Abb. 4: Klonierungsstrategie zur KO-Mutagenese. Gezeigt werden sowohl Struktur als auch Klonierungsschritte zur Erzeugung der verwendeten Plasmide. a) Isolation genomischer DNA; b) PCR; c) Isolierung der Kanamycin-Resistenz; d) Einfügen des Genes X in pEco; e) Unterbrechung des Genes X durch Insertion der Kanamycin-Kassette nach blunt-end Restriktion; f) *EcoRI*-Restriktion mit Eliminierung des Replikationsursprungs und Suicide Vektor Herstellung. Angegeben sind relevante molekulare Marker, sowie entsprechende Restriktionsschnittstellen (*bla* = beta-Laktamase; *rep(pMB1)* = Replikationsursprung; MCS = multiple cloning site).

Selektionsmarker unterbrochen werden. Hierzu wurde eine Kanamycin-Resistenz möglichst mittig in den aus *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* stammenden DNA-Bereich eingebracht. Dadurch sind eine korrekte Expression und die damit verbundene katalytische Aktivität des Genproduktes nicht mehr gewährleistet.

Zur Erzeugung von Mutanten wurden zunächst die vorhandenen Sequenzen (Anhang II) in den erzeugten pEco-Vektor über „blunt-end“-Klonierungen eingefügt. Die so erhaltenen Konstrukte (Kap. 2.1.3) wurden dann durch weiteres Einfügen des Kanamycin-Resistenzmarkers unterbrochen. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Aufrechterhaltung des so erzeugten „K.O.“-Konstruktes ohne weiteres möglich. Nach Restriktion mit *EcoRI* wurde nachfolgend der Replikationsursprung eliminiert und der restliche Anteil des „K.O.“-Konstruktes religiert. Die so erzeugten zirkulären DNA-Moleküle werden durch Elektroporation in kompetente *Eca*-Zellen (Kap. 2.1.5.3) eingebracht, in denen sie nun über homologe Rekombination ins Genom integrieren können (Abb.5).

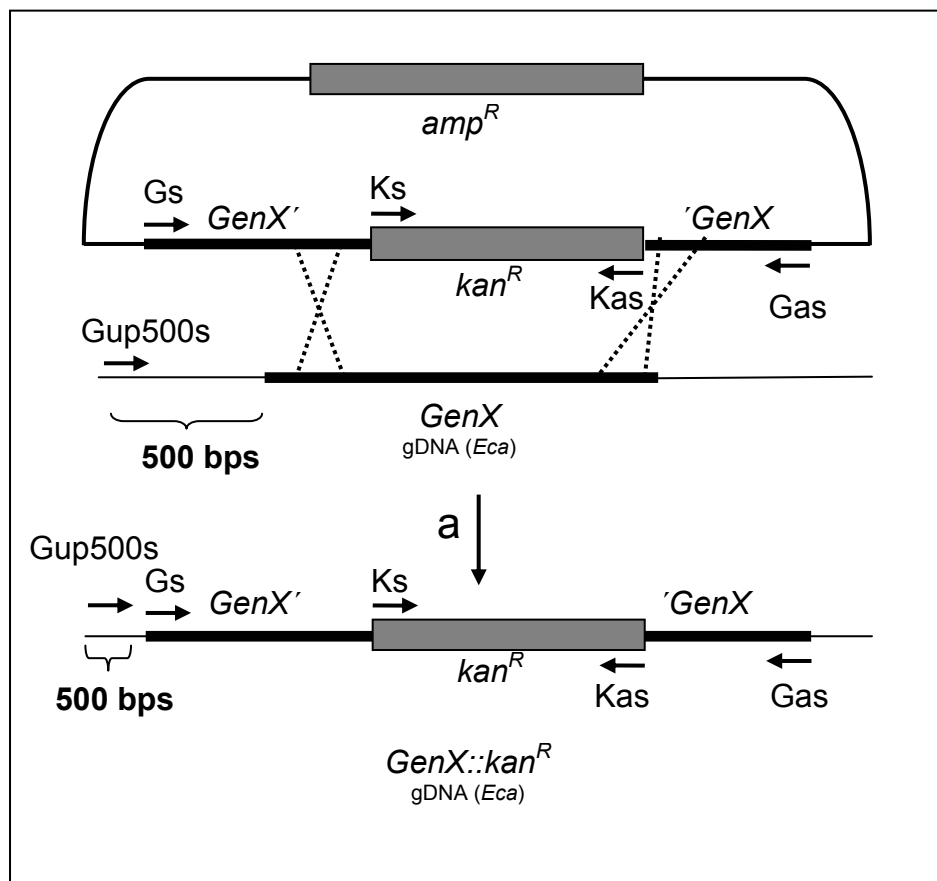


Abb. 5: Schema zum „double crossing-over“ Ereignis in *Erwinia carotovora ssp. atroseptica*. Gezeigt ist die Lokalisierung relevanter Genbereiche vor und nach der Rekombination (a). Primerbindestellen: Ks-Kanamycin sense-Primer; Kas-Kanamycin antisense-Primer; Gs-Gen sense-Primer; Gas-Gen antisense-Primer; Gup500s-ca. 500 Basenpaare „upstream“ vom Start ATG liegender sense-Primer.

Hierbei kann es zu einem „gene-Replacement“ kommen, bei dem über ein „double crossing-over“ Ereignis die jeweiligen DNA-Bereiche des Genoms und des „suicide“-Vektors ausgetauscht werden. Dies hat zur Folge, dass die intakte Kopie des bakteriellen Genoms durch die (mittels Kassetten-Mutagenese) zerstörte Kopie des „suicide“-Vektors ausgetauscht wird (Abb. 5).

Hierbei wird eine Mutante erzeugt, die defizient für das Genprodukt der Zielsequenz ist. Diese Mutante zeichnet sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zum Wildtyp durch Einbringen des Resistenzgens entsprechend Kanamycin-resistent ist, jedoch durch Verlust des Vektor-„backbone“ und damit auch der Ampicillin-Resistenz nicht mehr auf Ampicillin wächst. Durch Ausplattieren der Transformanten auf Selektionsplatten, kann somit nach den oben beschriebenen Kriterien überprüft werden, ob es sich um Mutanten aus „single“ oder „double“ „crossing-over“ Ereignissen handelt.

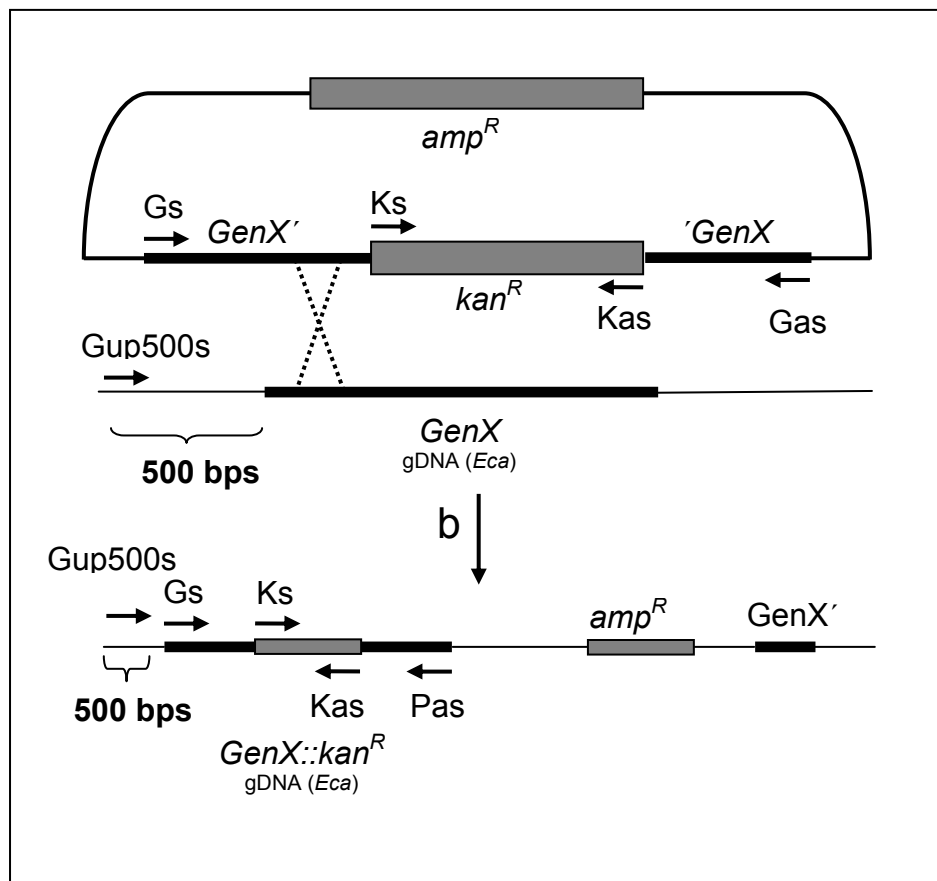


Abb. 6: Schema zum „single crossing-over“-Ereignis in *Erwinia carotovora ssp. atroseptica*. Gezeigt ist die Lokalisierung relevanter Genbereiche vor und nach der Rekombination (b). Primerbindestellen: Ks-Kanamycin sense-Primer; Kas-Kanamycin antisense-Primer; Gs-Gen sense-Primer; Gas-Gen antisense-Primer; Gup500s-ca. 500 Basenpaare „upstream“ vom Start ATG liegender sense-Primer.

Eine weitere Möglichkeit wäre das erwähnte „single crossing-over“ Ereignis bei dem das gesamte „K.O.“-Konstrukt in das Genom inseriert. Hierbei kann die bakterielle Kopie des Ziel-Gens zwar auch zerstört werden, jedoch besteht die Möglichkeit, dass durch ein „Crossing-over“ hinter dem Insertionsbereich der Kanamycin-Kassette ein intaktes Wildtyp-Gen zurückbleibt und es lediglich zu einer Insertion des verbleibenden Vektor-Anteils in das bakterielle Genom kommt. Solche Mutanten sind durch Integration und Expression des Ampicillin-Resistenzgens sowohl zum Wachstum auf Ampicillin als auch auf Kanamycin befähigt (Abb. 6).

Durch diese einfache Selektion, die Element des hier neu etablierten Systems ist, kann die Anzahl der erzeugten Transformanten in einem ersten Schritt deutlich auf putativ richtige Mutanten begrenzt werden. Diese können dann durch PCR weiter charakterisiert werden. Hierzu werden durch die in Abb. 5 und Abb. 6 angegebenen Primer verschiedene PCR-Reaktionen (Kap. 2.1.5.5) durchgeführt. Das hierbei entstehende charakteristische Bandenmuster und die vorhergehende Antibiotika-Selektion erlauben eine Unterscheidung zwischen Wildtyp- und Mutanten-Zellen, als auch eine zuverlässige Identifizierung von Mutanten, die aus einem double crossing-over Ereignis hervorgingen.

2.1.5.12 RNA-Isolierung

Um die Expression von Genen in verschiedenen Organismen oder die Reaktion auf verschiedene Umweltbedingungen auf RNA-Ebene nachzuweisen, wurde aus den jeweiligen Organismen Gesamt-RNA für eine anschließende „Northern-Blot“-Analyse (Kap. 2.1.7.13) isoliert.

- *E.carotovora*: Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden die jeweiligen Erwinien-Stämme im gewünschten Medium über Nacht bei 28°C inkubiert. Hierbei wurde auf LB-Vollmedium, *Erwinia* Minimalmedium, als auch M9-Minimal-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) zurückgegriffen. Die über Nacht gewachsenen Kulturen wurden zentrifugiert (5000 g, 5min, 4°C) und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1% Endkonzentration) behandeltem H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Um Gesamt-RNA aus Erwinien-Zellen nach Befall von Kartoffelgewebe zu isolieren, wurden Knollenscheibchen wie in Kap. 2.3.1 beschrieben mit Erwinien inokuliert. Nach Befall wurden die Scheibchen in DEPC-Wasser aufgenommen und durch Vortexen homogenisiert. Nach Filtration durch Rundfaltenfilter (Diagonal, Münster), wurde verbleibendes Kartoffelgewebe durch Zentrifugation (1200 g, 2min, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die

Bakterien durch erneutes Zentrifugieren (5000 g, 5min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde anschließend noch zweimal mit DEPC-Wasser gewaschen und schlussendlich in Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

- *S.cerevisiae*: Die Hefezellen wurden unter selektiven Bedingungen aerob bei 28°C angezogen und bei einer OD₆₀₀ = 1 geerntet (5 min, 5000 g, 4°C). Der mechanische Aufschluss der Hefen erfolgte bei Raumtemperatur in einem „Bead-Beater“ (Retsch-Milburn, Haan) bei 4600rpm für 3 mal 30 Sekunden. Die Reinigung und Anreicherung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Anweisungen des Herstellers. Das Prinzip hierbei beruht auf dem Lysieren und Homogenisieren der Proben mittels β-Mercaptoethanol und Guanidin-Isothiocyanat. Weiterhin wurden durch Zugabe von Ethanol, die benötigten Bedingungen geschaffen, damit die RNA an die in Säulen befindliche Silica-Membran binden kann. Die Verunreinigungen der RNA konnten durch Waschschrte weitgehend eliminiert werden. Die RNA wurde schlussendlich in RNase freiem Wasser aufgenommen.

Die Isolation bakterieller Gesamt-RNA erfolgte mit dem TRITidy G Reagenz (AppliChem, Darmstadt). Die auf der sauren Guanidin-Isothiocyanat/Phenol Extraktion basierende Methode, (Chomczynski P., 1993) mit anschließendem Ausschütteln der Protein-Verunreinigung mittels Chloroform wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.1.5.13 Formaldehyd-Gele zur Auftrennung von RNA-Molekülen

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA-Molekülen erfolgte nach der Methode von Lehrach *et al.* (1977) und Sambrook *et al.* (1989) in Formaldehyd-Gelen. Als Laufpuffer wurde einfach MOPS-Puffermedium benutzt (Sambrook, *et al.*, 2001). Aufgetragen wurden jeweils 15µg RNA.

2.1.5.14 Transfer von RNA-Molekülen auf Nylonmembranen („Northern-Blotting“)

Zum Nachweis der gewünschten mRNA durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde die Gesamt-RNA nach Auftrennung in einem Formaldehydgel (Kap. 2.1.5.13) über Nacht mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Macherey & Nagel, Düren) übertragen. Hierzu wurde zehnfach konzentrierter SSC-Transferpuffer (0,15M Natriumcitrat, 1,5M NaCl, pH7,0) benutzt. Der Aufbau des „Northern-Blot“ erfolgte nach Sambrook *et al.*, 2001.

2.1.5.15 Fixierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Die auf Nylonmembran transferierte RNA wurde mit Hilfe eines UV-Ofens (Spectronics Corporation) durch UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$ ($120 \text{ mJ} \times \text{cm}^2$) kovalent auf der Membran fixiert.

2.1.5.16 Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden

Radioaktiv markierte Sonden wurden hergestellt, um entsprechende RNA-Transkripte durch Hybridisierung mit den oben genannten Sonden auf einem Northern-Blot (Kap. 2.1.5.13) spezifisch nachzuweisen.

Die Markierung der DNA-Sonde erfolgte mittels Zugabe der Klenow Polymerase in einem fünffach konzentrierten Markierungsmix. Dieser enthielt neben der DNA-Polymerase noch unmarkierte deoxy-Nukleotide, ausgenommen dCTP und random-Hexanukleotidprimer. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden das radioaktiv markierte Nukleotid [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP verwendet ($3000\text{Ci} \times \text{mmol}^{-1}$; Amersham Biosciences, Freiburg). Für die Synthese wurden ca. 150-250ng homologe DNA eingesetzt. Um die nicht-eingebauten Nukleotide von der synthetisierten DNA-Sonde zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz nach der Amplifikation durch eine Gelfiltrationssäule (Sephadex-G50; Amersham Biosciences, Freiburg) bei 3000rpm (Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Osterode) abgetrennt. Im Durchlauf befand sich die fertige Sonde.

2.1.5.17 Hybridisierung der Gesamt-RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur Hybridisierung mit homologen Sonden wurden die Nylonmembranen mit der fixierten RNA zur Absättigung unbesetzter Membranbindungsstellen erstmals zweimal 30min bei 60°C in Hybridisierungspuffermedium (Church *et al.*, 1984) im Hybridisierungssofen vorhybridisiert (Biometra, Göttingen). Die radioaktiv markierte Sonde wurde für 10min bei 95°C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Die einzelsträngige DNA-Sonde wurde zu frischem Hybridisierungspuffermedium gegeben, in der dann die Membran über Nacht bei 65°C hybridisiert wurde. Um die unspezifisch gebundenen Sonden-Moleküle von der Membran zu entfernen, wurden diese zweimal für 15min mit vorgewärmtem Waschpuffermedium 1 (40mM Na_2HPO_4 , 1mM EDTA, 5% (w/v) SDS, pH7,2) bei 60°C sowie einmal für 10min bei Raumtemperatur mit Waschpuffermedium 2 (40mM Na_2HPO_4 , 1mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH7,2) inkubiert. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit einem

Cyclone Storage Phosphoscreen (PerkinElmer Life Sciences, Amersham Biosciences, Freiburg) für eine Stunde bis zu einem Tag bei Raumtemperatur exponiert und analysiert.

Um die Nylonmembranen für weitere Hybridisierungen benutzen zu können, wurden die gebundenen Sonden von den Membranen entfernt, indem diese für eine halbe Stunde in zuvor aufgekochtem Strip-Puffermedium (0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, 10% (w/v) SDS, pH 7,0) bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

2.1.5.18 Phosphoimager-Analyse der radioaktiv markierten Membranen

Die hybridisierten Membranen wurden nach dem Trocknen zur Quantifizierung der Radioaktivität für einige Stunden mit einem Packard MP Storage Phosphor Screen (Packard, Darmstadt) in einer lichtundurchlässigen Expositionskassette (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert. Die Auswertung erfolgte am Cyclone™-Storage Phosphor System Scanner (Packard, Darmstadt).

2.1.5.19 DNA-Sequenzanalyse

Zur Kontrolle von Klonierungsschritten wurde eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt, wofür der Sequenzierservice des Nano-Bio-Center (NBC) der TU Kaiserslautern in Anspruch genommen wurde.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von wässrigen Lösungen ohne Detergenzien wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurde die zu bestimmende Proteinlösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 500µl aufgefüllt und mit 500µl Bradford-Farbreagenz (Tab. 2.8) versetzt. Dieser Ansatz wurde für 10-15min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Proteingehalt wurde gegen einen Leerwert (500µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ +500µl Farbreagenz) bei einer Wellenlänge von 595nm im Spektralphotometer (Biophotometer; Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgeraden diente Rinderserumalbumin (BSA). Der Proteingehalt in detergenzhaltigen Lösungen wurde mit einer Bicinchonininsäure-Kupfersulfat-Lösung (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) nach Anweisung des Herstellers ermittelt.

Tab. 2.8: Zusammensetzung des Bradford-Reagenz

Bradford-Reagenz:	Coomassie-Brilliant Blue G250	50 mg in 10ml Ethanol p.a. gelöst
	ortho-Phosphorsäure (85%)	175ml ad 825ml H_2O

2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Die diskontinuierlichen Elektrophoresen erfolgten in vertikalen Elektrophoresekammern (Serva, Heidelberg; BioRad, München; Eigenbau, Uni-KL) mit einem 10-15%igen Trenngel und einem 3%igen Sammelgel. Die Proben wurden mit einem Probenpuffermedium (62,5mM Tris-HCl pH 8,3; 0,05% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerin; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 20mM DTT_{red}) versetzt und nach Auftragen der Proben erfolgte die Trennung bei einer konstanten Spannung von 80-120 Volt. Als Molekulargewichtsstandard wurde das Proteingemisch „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB, Schwalbach) verwendet. Dieser wurde vor seiner Verwendung für 1min bei 95°C aufgekocht und anschließend kurz auf Eis abgekühlt.

Das Anfärben der Proteine im Gel erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,25% (w/v) in 45% (v/v) Methanol und 9% (v/v) Eisessig). Zur Entfärbung wurden die Gele über Nacht bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 5% Methanol und 7,5% Eisessig inkubiert. Das Trocknen der Gele erfolgte mittels „DryEase Mini-Gel Drying“ System (Novex, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3 Western-Blot und Immuno-Printing

Das durch SDS-Page aufgetrennte Proteingemisch wurde durch Elektro-Blotting auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 2µm (BioTrace[®] NT; VWR, Darmstadt) übertragen. Hierzu wurde das „Wet-Blotting“-Verfahren in einem MiniTank[™] Elektrobloetter Modell VEP-2 (PeqLab, Erlangen) angewandt. Das zu blottende SDS-Gel wurde in Transferpuffer für 5min äquilibriert und anschließend, für 2 Stunden mit 500mA bei 4°C in gleichem Puffer (25mM Tris/HCl, 192mM Glycin, 20% (w/v) Methanol, 1% (w/v) SDS, pH 8,3) geblottet. Die nach dem Transfer vorhandenen freien Bereiche auf der Membran wurden durch Inkubation für eine Stunde in TBS-Puffer (20mM Tris/HCl, 150mM NaCl, pH 7,5) mit 3% BSA-Lösung abgesättigt. Überschüssiges BSA als auch Antikörper wurden durch Waschen der Membran, für jeweils 10min in TBS-Puffer, und TBST-Puffer (20mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20 pH 7,5) entfernt. Zur Detektion entsprechender Proteine wurden Anti-„Histidin-Tag“ Antikörper (Qiagen, Hilden), als auch Anti-Maus IgG Antikörper (Dianova, Hamburg), eingesetzt. Der Protein-Antikörper Nachweis erfolgte enzymatisch durch das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym, Merretich-Peroxidase. Dazu wurden 15mg 4-Chloronaphtol (in 5ml Methanol p.a.) und 25ml TBS-Lösung auf die Membran gegeben und die Farbreaktion durch Zugabe von 15µl H₂O₂ gestartet.

2.2.4 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen im *E.coli*-Stamm BL21 (DE3)pLysS bzw. im *E.coli*-Stamm C43 (DE3)

Die *E.coli*-Stämme BL21 (DE3) pLysS, C43 (DE3), BLR und BL-codon usage plus (BL+) stellen in Verbindung mit pET-Plasmidvektoren (Novagen, Heidelberg) geeignete bakterielle Expressionssysteme für rekombinante Proteine dar (Studier *et al.*, 1990).

Insbesondere für die heterologe Expression von Membranproteinen zeichnet sich der *E.coli*-Stamm C43 aus (Miroux & Walker, 1996).

Zur heterologen Expression von Proteinen wurden kompetente BL21-, BL+ bzw. BLR-Zellen mit geeigneten Expressionskonstrukten transformiert und schließlich unter selektiven Bedingungen auf YT-Agarplatten ausplattiert. Die kodierenden Bereiche wurden so in das Leseraster des pET-Vektors inseriert, dass nach Expression, die rekombinanten Proteine eine N-terminale Sequenzerweiterung in Form von zehn Histidinen tragen.

Für die heterologe Expression wurden 500ml TB-Medium oder YT-Medium 1:100 mit den jeweiligen transformierten BLR-Zellen angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C aerob wachsen gelassen und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Nach etwa 45minütigem Wachstum wurden die Bakterienzellen schließlich durch Zentrifugation (6000 g, 10min, 4°C) geerntet und in 1,5ml Aufschlusspuffermedium (10mM Tris/ HCl, 1mM EDTA, 15% Glycerin, pH7,5) resuspendiert. Mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung (3×2min) erfolgte der Aufschluss der Zellen unter Eiskühlung. Nach Zentrifugation der Zelltrümmer (10000 g, 10min, 4°C) konnte der Überstand zur Anreicherung von Membranproteinen (Kap. 2.2.5) weiterverwendet werden.

2.2.5 Anreicherung von Membranproteinen

Nach der in 2.2.4. beschriebenen heterologen Expression von rekombinanten Proteinen kann der nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer erhaltene Überstand zur Anreicherung von Membranproteinen weiterverwendet werden. Hierzu muss der erhaltene Überstand einer einstündigen Ultra-Zentrifugation bei 100.000g und 4°C unterzogen werden. Bei diesem Schritt werden die Membranen und die in ihnen lokalisierten Membranproteine pelletiert, die löslichen Proteine dagegen bleiben im Überstand. Der lösliche Überstand wird verworfen und das Membran-Pellet in 50/5-Puffer (50mM Hepes, 5mM MgCl₂, pH 7,5) aufgenommen. Durch Zugabe von Detergens (z.B. DDM; bzw. Triton x-100) können die integralen Proteine aus den Membranen gelöst werden. Hierzu wird nach Inkubation und Auffüllen mit 50/5 Puffermedium eine erneute Zentrifugation benötigt, um die entsprechenden Membranproteine zu pelletieren.

2.2.6 Transportversuche an intakten *E.coli*-Zellen

Zum Nachweis der funktionellen Expression der untersuchten Transporter in der Plasmamembran wurden Transportversuche an intakten *E.coli*-Zellen des Stammes BL21, BLR bzw. BL+, die mit einem entsprechenden pET-Expressionskonstrukt transformiert wurden, durchgeführt.

Aus einer Übernachtskultur wurden 50ml YT-Medium mit den *E.coli*-Zellen 1:100 angeimpft und bei 37°C in einem Kolben mit Schikane geschüttelt. Nach Erreichen einer Bakteriendichte von $OD_{600} \sim 0,5$ wurden die Zellen mit 1mM IPTG induziert und für weitere 30-60 Minuten angezogen. Durch Zentrifugation wurden die Bakterien schließlich geerntet (10min, 5000g, 4°C) und mit 50mM KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,2) auf eine optische Dichte von 5 eingestellt.

Jeweils 100µl IPTG-induzierter Zellen wurden zu 100 µl Transportmedium gegeben, das sowohl radioaktiv markiertes, als auch nicht markiertes Substrat enthielt. Das Abstoppen der bei 30°C in einem Eppendorf-Thermoblock (Hamburg) inkubierten Ansätze erfolgte zu entsprechenden Zeitpunkten durch Filtration der Zellen über Nitro-Zellulose-Filter (GN6 Membran Filter, Porengröße 0,45µm, Durchmesser 25mm; VWR, Mannheim). Diese wurden durch zweimalige Zugabe von 4ml eiskaltem 50mM KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,2) gewaschen und anschließend in Szintillationsgefäße gegeben. Die Radioaktivität konnte direkt in einem Tricarb 2500 Beta-Szintillationszähler (Packard, Darmstadt) quantifiziert werden.

2.2.7 Transportversuche an intakten *E.carotovora ssp. atroseptica* Zellen

In dieser Arbeit wurden auch Transportversuche mit intakten *Erwinia carotovara ssp. atroseptica* durchgeführt. Hierzu wurde aus einer Übernachtskultur 50ml entsprechendes Medium 1:100 angeimpft und bei 28°C in einem Kolben inkubiert. Je nachdem welches Aufnahmesubstrat bereitgestellt wurde, mussten die Bakterien in verschiedenen Medien unter verschiedenen Bedingungen kultiviert werden. Für eine aerobe Anzucht wurde wie unter 2.2.6 beschrieben vorgegangen, jedoch mit einer angepassten Inkubations-Temperatur von 28°C. Für eine anaerobe Anzucht der Erwinien-Zellen wurden Schüttelkölbchen ohne Schickane fast randvoll gefüllt, der Restsauerstoff mit Stickstoff verdrängt und die Kolben mit Parafilm abgedichtet. Für den Nachweis der Magnesium gekoppelten Citrat Aufnahme wurden die Bakterien in M9-Minimalmedium mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle angezogen. Für alle weiteren Experimente sofern nicht näher beschrieben wurde LB-Vollmedium benutzt. Nach Erreichen einer Bakteriendichte von $OD_{600} \sim 1$ wurden die Zellen durch Zentrifugation (10min, 5000g, 4°C) geerntet und in 50mM MES/Tris-Puffer (pH 6,8)

zehnfach konzentriert. Die Durchführung der Aufnahmeversuche erfolgte nach Pos, Dimroth und Bott (Pos *et al.*, 1998) in einem Eppendorf-Thermoblock. Das Abstoppen der bei 25°C inkubierten Ansätze erfolgte zu entsprechenden Zeitpunkten durch Zugabe von 900µl 0,1M LiCl und anschließender Filtration der Zellen über Zellulose-Filter (GN6 Membran Filter, Porengröße 0,45µm, Durchmesser 25mm; VWR, Mannheim). Diese wurden durch zweimalige Zugabe von 1ml eiskaltem 0,1M LiCl gewaschen und anschließend in Szintillationsgefäße gegeben. Die Radioaktivität konnte direkt in einem Tricarb 2500 Beta-Szintillationszähler (Packard, Darmstadt) quantifiziert werden.

2.2.8 Transportversuche an intakten *S.cerevisiae*-Zellen

Nach der Transformation von Hefe-Zellen mit speziellen Expressionsvektoren wurden Transportversuche an intakten *S.cerevisiae*-Zellen durchgeführt. Hiermit soll eine funktionelle Expression der jeweiligen Transportproteine nachgewiesen werden. Als Expressionssystem diente der auf dem starken konstitutiven pMA1-Promoter basierende pDR196-Vektor. Dieser erlaubt eine ebenfalls konstitutive Expression von Genen die ihm nachgeschaltet werden und somit in Verbindung mit einem passenden Hefe-Stamm ein geeignetes System zur Durchführung von Aufnahmeversuchen. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Hefe-Stämme als Vorkultur in Minimalmedium über Nacht bei 28°C angezogen. Mit dieser wurden 50ml Minimalmedium einer OD von 0,2 entsprechend angeimpft. Das Wachstum der Hefezellen erfolgte aerob bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ ~ 1. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 g, 5min, 4°C) geerntet und mit kaltem Aufnahme-Puffer (50mM KH₂PO₄, 0,7M Sorbitol pH 7,2) gewaschen. Nach Einstellen einer OD₆₀₀ von 5 in Aufnahme-Puffer, erfolgten die Aufnahmeversuche wie unter Kap. 2.2.6 beschrieben mit Hilfe der Filter-Absaugtechnik.

2.2.9 Anzuchtversuche zur Determinierung des Wachstums und Stoffwechsels von *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen

Das Gram negative Bakterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* ist sowohl zu aeroben als auch anaerobem Wachstum befähigt. Da diese Umweltbedingungen über verschiedene Stoffwechselwege bewältigt werden ist eine komplexe Regulation notwendig, die diese der jeweiligen Energiequelle als auch der Umgebung anpasst. Besonders Kohlenstoffquellen haben einen sehr starken Einfluss auf das aerobe, respektive anaerobe Wachstum. In dieser Arbeit wurden auch Regulatorproteine des bakteriellen Stoffwechsels beeinflusst, welche die Verwertung und das Wachstum auf verschiedenen

Kohlenstoffquellen beeinflussen. Um die Auswirkungen näher zu charakterisieren wurden Anzucht- und Wachstumsbedingungen auf M9 Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 2001) Agarplatten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen durchgeführt. Zur Überprüfung des Wachstums und der Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen wurden entsprechende Erwinien-Kulturen über Nacht bei 28°C aerob inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (5000 g, 5min, 4°C) geerntet. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in sterilem Wasser, wurde eine $OD_{600} \sim 1$ eingestellt. Ausgehend von dieser Bakteriensuspension wurden für die zu untersuchenden Stämme sukzessive 1:100 Verdünnungsreihen angelegt. Jeweils 5µl der entsprechenden Suspension und ihrer Verdünnungen wurden dann auf die jeweiligen Agarplatten getropft. Die entsprechenden Kohlenstoffquellen (Tab. 2.7) wurden mit oder ohne Nitrat als Stickstoffquelle eingesetzt. Nach vorangegangener Beschreibung beimpfte Agarplatten wurden dann nach Bedarf aerob oder anaerob im Anaerobiertopf (Anaerocult; Merck, Darmstadt) bei 28°C für drei Tage inkubiert.

Tab. 2.9: Zusammensetzung der verwendeten Minimalmedium-Kombinationen

	Kohlenstoffquelle (Endkonzentration)	Nitrat-Zugabe
M9-Minimalmedium mit	10mM Glukose	-
	10mM Glukose	50mM NaNO ₃
	50mM Fumarat	-
	50mM Fumarat	50mM NaNO ₃
	50mM Citrat	-
	50mM Citrat	50mM NaNO ₃
	50mM Glycerin	-
	50mM Glycerin	50mM NaNO ₃

2.2.10 Hefekomplementation

Eine Komplementation bezeichnet gemeinhin einen Vorgang bei dem ein bestehender Defekt oder eine Insuffizienz eines Zielorganismus durch das Einbringen eines Gens und dessen Genproduktes aufgehoben wird. Äußert sich der Defekt in einem bekannten und beobachtbaren Phänotyp, so kann dieser benutzt werden um die Funktion eines fremden Genproduktes unbekannter Funktion zu identifizieren. Hebt die Einbringung des Gens und somit des Genproduktes den Phänotypen auf, so komplementiert das Gen den bestehenden Defekt. Dadurch erlaubt diese Methode eine indirekte biochemische

Charakterisierung eines unbekannten Genproduktes. In dieser Arbeit wurde versucht zwei verschiedenen Hefestämmen zu komplementieren.

- Hefestamm 22 Δ 8AA: Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Aminosäure-Transportermutante (Fischer *et al.*, 2002). Diese Mutante zeichnet sich durch das Fehlen von acht Aminosäure-Transportern aus. Dadurch ist es diesem Stamm nicht mehr möglich auf Medium mit Arginin, Aspartat, Citrullin, GABA, Glutamat oder Prolin, Histidin und Lysin als einziger Stickstoffquelle zu wachsen (Fischer *et al.*, 2002). Durch das Einbringen einer Gensequenz in einem entsprechenden Expressionskonstrukt kann nun versucht werden die bestehende Defizienz zu komplementieren. Hierzu wurden die unter 2.1.3 aufgelisteten Vektoren in den 22 Δ 8AA Stamm transformiert (Kap. 2.1.5.2). Eine Überprüfung auf erfolgreiche Komplementation wurde hierbei durch Selektionstests und Aminosäureverwertung nach Fischer *et al.*, 2002 durchgeführt.
- Hefestamm Δ Stl1: Generell ist es *S.cerevisiae* möglich auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Auch auf Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle sind diese Zellen zum Wachstum befähigt. Der hier beschriebene Stamm wurde durch Selektion von Hefe-Mutanten, die nicht oder nur sehr schlecht auf Glycerin wachsen können, identifiziert (Ferreira *et al.*, 2005). Die vom Carlsberg Laboratory (Denmark) zur Verfügung gestellte Mutante weist eine Insertion in dem *stl1* Gen auf und ist dadurch defizient für dieses Genprodukt. Hierbei handelt es sich um ein plasmamembran-ständiges Transportprotein, welches höchstwahrscheinlich die Aufnahme von Glycerin im Symport mit Protonen ermöglicht. Durch Transformation dieser Mutante mit denen in 2.1.3 aufgeführten Expressionsvektoren kann ermittelt werden, ob das Genprodukt der im Vektor enthaltenen DNA-Sequenz das Wachstum auf Glycerin dieser Mutante wieder herstellt. Somit kann mit hoher Wahrscheinlichkeit die Funktion des unbekannten Proteins als Glycerin-Aufnahmesystem bestätigt werden.

2.2.11 Erwinien-Komplementation

Neben den oben beschriebenen biochemischen Möglichkeiten die eine Komplementation bietet, kann hierdurch auch gezeigt werden, dass die bestehende Defizienz nicht auf pleiotrophen Effekten beruht sondern einzig und alleine auf einer nicht funktionellen Gensequenz und folglich dem Fehlen des entsprechenden Produktes. Um eben dieses hinsichtlich der erzeugten Erwinien-Mutanten zu zeigen, wurde eine Komplementation entsprechender Zellen durchgeführt. Hierzu wurden kompetente Zellen (Kap. 2.1.5.3) des jeweiligen Stammes mit einem Konstrukt (Kap. 2.1.3) transformiert welches die Expression

des fehlenden Gens unter der Kontrolle des nativen Promotors ermöglicht und dadurch den bestehenden Gendefekt kompensiert. Die Anzucht und Selektion der Erwinien-Zellen erfolgt wie unter 2.1.1 und 2.2.9 beschrieben.

2.2.12 Bestimmung der Citrat-Konzentration an *S.tuberosum* Knollengewebe

Zur Bestimmung des Gesamt Citrat-Gehaltes von Kartoffelknollengewebe wurde eine photometrische Bestimmung nach Lowry & Passoneau, (1972) durchgeführt. Hierzu wurden Knollen von Wildtyp und NTT-antisense Pflanzen, die in Größe und Alter in etwa vergleichbar waren gewaschen und anschließend getrocknet. Dann wurden die Knollen in etwa drei Millimeter dicke Scheiben geschnitten. Anschließend wurden sofort mittels eines Korkbohrers Knollenscheibchen ausgestanzt und unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Knollenscheibchen wurden dann in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zu Pulver zerkleinert. Jeweils 100mg des so gewonnenen Pulvers wurden in 1,5ml Reaktionsgefäßen eingefüllt und diese wurden wiederum in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Durchführung des Tests wurden diese Aliquots mit 1ml sterilem Wasser versetzt, gevortext und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (1min, 13000 g, 4°C) wurde der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hiervon ausgehend wurde der photometrische Test mit verschiedenen Probevolumina des Überstandes durch Zugabe der Citrat-Lyase gestartet. Eine negativ-Kontrolle mit dem gleichen Probevolumen an Wasser wurde auch gemessen. Nach dem Erreichen eines „steady-states“, wurde ausgehend von der Abnahme der Extinktion eine Steigung angelegt mittels der, durch Berücksichtigung sämtlicher Verdünnungsfaktoren die eigentliche Konzentration von Citrat bestimmt wurde.

2.2.13 Bestimmung der Veränderung von Metaboliten in *S.tuberosum* Knollengewebe in Gegenwart oder Abwesenheit von *Eca*

Die Bestimmung der Metabolit-Gehalte in Kartoffelknollengewebe sowie deren Veränderungen und Auswertung in Gegenwart oder Abwesenheit von *Eca*-Zellen wurden durch Thomas Reinhold (AG Neuhaus) sowie der freundlichen Unterstützung und Kooperation von Dr. P. Geigenberger (MPI, Golm) durchgeführt.

2.3 Phytopathologische Methoden

2.3.1 Inokulation von Kartoffelknollengewebe mit *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Inokulationsversuche mit heterotrophem Kartoffelgewebe wurden mit Wildtyp, als auch NTT-antisense Kartoffelknollen durchgeführt welche nach der Ernte bis zu vier Monate bei 4°C gelagert wurden. Die für den Versuch und die Inokulation vorgesehenen Bakterienkulturen wurden am Vortag in *Erwinia* Minimalmedium 1:500 aus einer im Vollmedium gewachsenen Übernacht Kultur angeimpft und anschließend für 24 Stunden aerob bei 28°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die entsprechenden Kartoffelknollen mittels Wasser von Erdrückständen befreit und mit 70% Ethanol oberflächen-sterilisiert. Nach weiterem Abwaschen unter Wasser wurden die Knollen abgetrocknet und in 3mm dicke Scheiben geschnitten. Aus diesen Scheiben wurden dann mittels eines Korkbohrers repräsentative Knollenstücke mit einem Durchmesser von 1cm ausgestanzt. Diese Scheibchen wurden dann auf zuvor vorbereitete Petrischalen platziert. Diese wurden vorher mit vier Lagen Saugpapier ausgelegt und mit Wasser befüllt. Das Wasser wurde abgeschüttet und das Saugpapier passend in die Petrischale fixiert. Während dem Bestücken der Schalen mit entsprechenden Knollenscheibchen wurden die Bakteriensuspensionen fertig gestellt. Hierzu wurden die über Nacht gewachsenen *Erwinia*-Kulturen geerntet (5000 g, 5min, 4°C) in sterilem Wasser resuspendiert und eine OD₆₀₀ ~ 1 eingestellt. Ausgehend dass bei einer OD₆₀₀ ~ 1 die Zellzahl $8 \cdot 10^8$ Zellen/ml entspricht, wurde eine korrespondierende Verdünnung angefertigt und eine ungefähre Zellzahl von 1000 Zellen/μl eingestellt. Die in den Petrischalen befindlichen Knollenscheibchen wurden mit jeweils 8μl dieser Verdünnung, also ca. 8000 Zellen inokuliert. Die mit den inokulierten Scheibchen versehenen Petrischalen wurden mit Parafilm (Menasha, WI; USA) verschlossen und für 36 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte bei sichtbarer Mazeration der Kartoffelscheibchen. Hierzu wurde vorerst das Gewicht der Knollenscheibchen mit einer Feinwaage (Sartorius, Bickenbach) bestimmt und anschließend das mazerierte Gewebe unter fließendem Wasser und leichtem Druck abgewaschen. Das verbleibende intakte Gewebe wurde abgetrocknet, von Restflüssigkeit befreit und schließlich nochmals gewogen. Die hieraus resultierende Differenz wurde als Prozentsatz an intaktem Gewebe zur Quantifizierung der Mazeration und der Virulenz von *Erwinia* weiter verwendet.

2.3.2 Inokulation von Kartoffelknollengewebe mit *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* Zellen unter anaeroben Bedingungen

Falls benötigt wurden die oben beschriebenen Knollen-Inokulationsversuche auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst wie unter 2.3.1 vorgegangen. Nachdem die entsprechenden Knollenscheibchen mit den jeweiligen *Erwinia*-Stämmen versehen waren, wurden die Petrischalen jedoch nicht mit Parafilm versiegelt, sondern in einem Anaerobiertopf (Anaerocult; Merck, Darmstadt) gegeben und für 36 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung der Tests verlief analog zu den zuvor beschriebenen aeroben Inokulationsversuchen.

2.3.3 Vakuum-Infiltration von Kartoffelscheibchen

Um *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* mit veränderten Umweltbedingungen *in-vivo* zu konfrontieren wurden Infiltrationsversuche mit Kartoffelscheibchen unternommen. Da die Metaboliten-Zusammensetzung von Gewebe schwer manipulierbar ist, und ein Eingreifen von Außen in den zellulären Stoffwechsel schwer durchführbar ist, kann nur die Zusammensetzung des Apoplasten künstlich verändert werden. Da sich *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* bei Befall im Apoplasten des parenchymatischen Gewebes multipliziert, ist eine gezielte Veränderung seiner Zusammensetzung und die folgende Reaktion von *Erwinia* durchaus von Interesse. Zur Durchführung der Infiltration wurden wie unter 2.3.1 beschrieben repräsentative Knollenscheibchen präpariert. Diese wurden dann in 100 ml MES-Puffer (0,5g/l, pH 5,7) mit oder ohne entsprechende Substrate über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Scheibchen in einem Exikator mittels einer Wasserstrahlpumpe unter Vakuum für 45 Minuten infiltriert. Hierbei wird die im Interzellularraum befindliche Luft durch die umgebende Flüssigkeit ausgetauscht. Damit entspricht der Apoplast in seiner Zusammensetzung nun dem Medium in dem die Knollenscheibchen über Nacht inkubiert waren. Nach Beenden der Infiltration wurde das Inkubationsmedium abgeschüttet, die Kartoffelscheibchen kurz von anhaftendem Medium befreit und auf den unter 2.3.1 beschriebenen Petrischalen platziert. Die weitere Durchführung, sowie Auswertung der Versuche erfolgte analog zu 2.3.1.

2.3.4 Inokulation von ganzen Kartoffelknollen mit *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* Zellen

Im Feld beginnt eine *Erwinia*-Infektion oft durch Zellen, die sich in Lentizellen an der Kartoffel-Oberfläche eingenistet haben und breitet sich dann bis ins Innere der Knolle aus.

Um diesen Ablauf nachzustellen wurden die entsprechenden Kartoffelknollen mittels Wasser von Erdrückständen befreit und mit 70% Ethanol oberflächen-sterilisiert. Nach weiterem Abwaschen unter Wasser waren die Knollen zur Inokulation bereit. Aus einer wie unter 2.3.1 vorbereiteten Erwinienkultur wurden 20µl Zellen in einer sterilen 100µl Einwegspritze aufgezogen. Diese Spritze wurde dann in eine zu inokulierende Knolle eingestochen und dann durch Betätigen des Abwerfers darin belassen. Die so inokulierten Knollen wurden in einem dampfgesättigten Einmachglas für eine Woche bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Auswertung wurden die entsprechenden Knollen halbiert. Die jeweiligen Hälften gewogen, das mazerierte Gewebe unter fließendem Wasser mit leichtem Druck abgewaschen und nach dem Abtrocknen das verbleibende Gewicht bestimmt. Auch hier wurde wiederum der Prozentsatz an intaktem Gewebe ermittelt.

2.3.5 Untersuchung der pektolytischen Aktivität auf PEC-Platten

Obwohl schwer zu definieren, kann als direktes Maß zur Feststellung der Virulenz von *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* die pektolytische Aktivität, sprich die Fähigkeit zur Mazeration von Pflanzengewebe, benutzt werden. Ein Inokulationsversuch mit Kartoffelknollenscheibchen gibt zwar relativ zuverlässig die *in-vivo* Situation bei Befall von Erwinien-Zellen wieder, ist jedoch zur Einordnung der Virulenz beobachteter Mutanten-Stämme mit einem hohen Aufwand verbunden. Um schnell und ohne großen Aufwand eine grobe Einordnung vorzunehmen, bieten sich *in-vitro* Versuche mittels PEC-Platten an. Das Prinzip hierbei ist die Reduzierung der Virulenz auf die Fähigkeit Polypektat in Oligomere oder Monomere zu zersetzen und dies als direkt proportional zueinander zu betrachten. Dies bedingt, dass ein Stamm, welcher nicht oder nur bedingt in der Lage ist auf Knollenscheibchen zu wachsen oder aber auch eine geringere qualitative oder quantitative pektolytische Aktivität aufweist, in gleicher Weise den entsprechenden Phänotypen auf Polypektat-haltigen Platten zeigt. Zur Durchführung dieser Versuche wurde mit kalziumstabilisierten PEC-Platten (Collmer, Ried & Mount, 1988) gearbeitet. Hierzu wurde eine über Nacht in Minimalmedium gewachsene *Erwinia*-Kultur geerntet und mit PBS (Sambrook *et al.*, 2001) auf eine OD₆₀₀ ~ 1 eingestellt. Von dieser Suspension wurden jeweils 5µl auf eine PEC-Platte aufgetropft. Weiterhin wurde als Negativ-Kontrolle zur Feststellung von Kontaminationen 5µl PBS-Medium aufgetropft. Nach dem Einwirken der Spots und dem Verdunsten des Aufnahmemediums wurden die Platte dann mit Parafilm (Menasha, WI; USA) verschlossen. Nach einer Inkubation von drei Tagen bei Raumtemperatur wurden die Versuche ausgewertet. Hierbei erscheint auf den milchig trüben PEC-Platten nach Wachstum der Erwinien-Zellen ein leicht rosa-schimmernder Spot welcher die Wachstumszone kennzeichnet und der von einem klaren Hof umgeben ist. Der

Bakterien-Spot wird durch Wasser abgeschwenkt und die pektolytische Aktivität die sich durch den Durchmesser des entsprechenden klaren Hofes kennzeichnet, ausgewertet. Hierbei kann nur eine rein optische Auswertung erfolgen. Um diese zu erleichtern und den klaren Hof deutlicher von der restlichen Platte abzuheben, kann eine Gegenfärbung mit Ruthenium-Rot (Sigma-Aldrich, München) vorgenommen werden. Dazu wird die Platte mit 20 ml Ruthenim-Rot Lösung (0,1% in H₂O) versetzt und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Lösung abgekippt und die Platte nochmals unter fließendem Wasser abgespült. Durch die Gegenfärbung sind Bereiche in denen intaktes Polypektat vorliegt durch Einlagerung von Ruthenium-Rot dunkel-rot bis lila gefärbt, zu Oligo- bzw. Monomeren abgebautes Pektat erscheint dagegen als klarer nur leicht gefärbter Hof. Dieser kann dann ausgemessen und als Maß für die Virulenz verwendet werden.

2.3.6 Bestimmung der Colony forming Units (CFU) nach Inokulation von Kartoffel Knollenscheibchen mit *Erwinia carotovora ssp. atroseptica*

Um das Wachstum von Bakterien zu bestimmen gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Fitness eines Stammes besonders das Betreiben eines aktiven Stoffwechsels, wird jedoch am Besten durch die Bestimmung der Lebendkeimzahl ausgedrückt. Zu diesem Zweck wurden CFU-Versuche nach Befall von heterotrophem Kartoffelgewebe durch *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* durchgeführt. Hierzu wurden Inokulationsversuche wie unter 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Nach Inkubation wurden einzelne Knollenscheibchen in sterile physiologische NaCl-Lösung (0,9%) gegeben und homogenisiert. Die resultierende Bakteriensuspension wurde anschließend sukzessiven Verdünnungsreihen unterworfen. Die so erhaltenen 10⁻⁷ als auch 10⁻⁶ Verdünnungen wurden weiter zur Bestimmung der Lebendkeimzahl benutzt. Hierzu wurden jeweils 100µl der entsprechenden Verdünnung auf Minimalmedium Platten ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Die auf den Platten gewachsenen Bakterien wurden ausgezählt. Hiervon ausgehend wurden die CFU pro Knollenscheibchen bestimmt. Es wurden jeweils zwei unabhängige Experimente mit n=10 durchgeführt.

2.4 Elektronische Datenverarbeitung und Computergestützte Analysen

Die Fließschemata der benutzten Klonierungsstrategie wurden mit Hilfe des von SciEd Central hergestellten Programms Clonemanager 7 (Scientific Educational Software

Central) durchgeführt. Die angegebenen und benutzten Gensequenzen für die untersuchten Transporter wurden aus den Datenbanken *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL, www.ebi.ac.uk/embl) und *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen. Weitere Sequenzsuchen, sowie andere Analysen wurden mittels der auf Expasy.org enthaltenen Tool-Sammlung durchgeführt. Die DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm Clonemanager analysiert (Version 7; Scientific & Educational Software). Die Sequenzvergleiche von Proteinen und DNA-Sequenzen erfolgten mit dem ClustalW-Programm (Thompson, 1994), das im Internet unter <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> frei zugänglich ist. Zur manuellen Nachbearbeitung des Protein-Alignments wurde das Programm Genedoc verwendet (Nicholas *et al.*, 1997). Für alle weiteren elektronischen Verarbeitungen wurde auf das OfficeXP Paket zurückgegriffen (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim).

3 Ergebnisse

Der Ergebnissteil dieser Arbeit gliedert sich in vier Themengebiete.

Der erste Themenkomplex behandelt die molekulare, biochemische und phytopathologische Charakterisierung von *Eca* Mutanten bezüglich Prolin-Transport und Verwertung. Hierbei werden die erzeugten Mutanten und ihre Identifikation kurz erläutert. Weiterhin werden die Ergebnisse zur Aufklärung von Funktion und biochemischen Eigenschaften der entsprechenden Transporter vorgestellt. Schließlich wird in einem letzten Unterpunkt auf die phytopathologischen Untersuchungen bezüglich Virulenz und Mazeration der entsprechenden Mutanten in Bezug auf den *Erwinia*-Wildtypen, und das Verhalten der Bakterien auf Wildtyp Knollen eingegangen.

Im zweiten Teil wird auf den Galaktonat-Transport verwiesen. Auch hier werden die erzeugten Mutanten vorgestellt und analog zum ersten Teil weiter untersucht.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Karbonsäure-Transport und dem damit verbundenen Metabolismus von *Erwinia*. Neben der ausführlichen molekularen Charakterisierung ausgewählter Mutanten, werden auch biochemische Untersuchungen an Karbonsäure Transportproteinen vorgestellt. Des Weiteren wird versucht die Bedeutung der entsprechenden Transporter für den Befall von Kartoffelknollengewebe durch *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* zu ermitteln. Zusätzlich werden die Auswirkungen von Veränderung der Zusammensetzung von Karbonsäuren und deren Konzentration für Bakterium als auch Pflanze erläutert.

In einem vierten und letzten Teil werden biochemische Eigenschaften von ausgesuchten pilzlichen Transportproteinen vorgestellt. Anhand dieser soll im Diskussionsteil die Bedeutung der Proteine für die Virulenz des Reisbrand-Erregers *Magnaporthe grisea* analysiert werden.

3.1 Untersuchungen zur Prolinaufnahme und deren Bedeutung für die Virulenz anhand von *Eca* „K.O.“-Mutanten

Der Boden, das Habitat vieler phytopathogener Bakterien inklusive *Eca*, stellt einen über Zeit und Raum betrachteten, relativ inhomogenen Lebensraum dar. Dagegen erscheinen Pflanzenwurzeln als eine üppige und zuverlässige Quelle an äußerst unterschiedlichen Nährstoffen. Dies ist vor allem auf den an der Wurzel stattfindenden Stoffaustausch, bestehend aus Abgabe von Exudaten und Aufnahme von Substraten, zurückzuführen. Sowohl die Stoffzusammensetzung als auch ihre Auswirkungen auf verschiedenste Beziehungen zwischen Pflanze und Bakterien in dieser Rhizosphäre sind bisher noch nicht genau verstanden.

Jedoch gibt es einige Publikationen, die sich mit der Bedeutung von Prolin für die Wechselwirkungen zwischen phytopathogenen bzw. symbiotischen Bakterien und Pflanzen beschäftigen (Vilchez *et al.*, 2000; Fabro *et al.*, 2004).

Interessanterweise konnte durch Metaboliten-Untersuchungen an Wildtyp- als auch NTT-antisense Knollen gezeigt werden, dass NTT-antisense Knollen höhere Prolin-Konzentrationen aufweisen (Mitteilung von Dr. Geigenberger, MPI Golm). Weiterhin konnte durch „MicroArray“-Analysen bei Befall von Chrysanthemen durch *Erwinia chrysanthemi* die Akkumulation eines Transkriptes, welches für einen putativen Natrium-gekoppelten Prolintransporter kodiert, festgestellt werden (Okinaka *et al.*, 2002).

Hierdurch wurde eine Analyse von Prolin-Transportern aus *Eca* hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Virulenz sehr interessant. Aber auch die Durchführung einer molekularen und biochemischen Charakterisierung sollte Aufschluss über die Funktion des Transporters innerhalb des Stoffwechsels liefern.

3.1.1 ECA4218; ein putativer Natrium-gekoppelter Prolin-Transporter

3.1.1.1 Molekulare Charakterisierung

Da *Erwinia chrysanthemi* und *Eca* hinsichtlich Wirtsspezifität als auch Gensequenzen deutliche Unterschiede aufweisen, musste vorerst das entsprechende Homolog zu dem in Okinaka *et al.*, (Okinaka *et al.*, 2002) beschriebenen Gen gefunden werden. Hierbei wurde mittels BLAST-Analysen als wahrscheinlichstes Ergebnis der *Eca*-Lokus 4218 (e-Wert = $1,0 \cdot 10^{-134}$) angegeben (Daten nicht gezeigt). Als putative Funktion wurde nach in-silico Analysen ein Transport von Prolin gekoppelt an einen Natrium-Gradienten aufgeführt.

Im Anschluss wurde versucht diesen Gen-Lokus mittels der im Kap. 2.1.5.11 beschriebenen Vorgehensweise zu unterbrechen.

Wie beschrieben, wurde ein „K.O.“-Konstrukt für die als *Eca4218* bezeichnete Sequenz hergestellt. Um die weiteren Selektionsschritte zu erleichtern, wurde mittels PCR die Abfolge und Orientierung der zur „Knock-out“ Mutagenese erforderlichen DNA-Bereiche überprüft (Abb. 7). Mittels einer PCR-Reaktion, welche einer Gen-spezifischen Primerkombination (putPs/putPas) zu Grunde liegt konnte gezeigt werden, dass der Genlokus *Eca4218*, welcher in pCU22.1 enthalten ist, durch die Kanamycin-Resistenz Kassetten unterbrochen ist. Hierbei erscheint die in nativer Form 1496 Basenpaar große Gensequenz um ca. 1400 Basenpaare vergrößert, was auf eine erfolgreiche Unterbrechung durch die Kanamycin-Kassette zurückzuführen ist. Diese kann nochmals mittels den Resistenz-spezifischen Primern (Ks/Kas) als charakteristisches 700 Basenpaar großes PCR-Produkt nachgewiesen werden. Durch das Unterbrechen der *Eca*-Gensequenz mittels einer „blunt-end“ Insertion des Resistenzmarkers können zwei mögliche Orientierungen vorliegen.

Um die genaue Orientierung zu ermitteln wurden PCR-Analysen mit den vier möglichen Primerpaarungen, die sich aus jeweils einem Gen-spezifischen und einem Resistenz-spezifischen Primer ergeben, getestet. Hierbei wird davon ausgegangen, dass jeweils zwei dieser Paarungen charakteristisch für eine korrespondierende Orientierung der Kanamycin-Insertion sind. Daraus folgend sollten die verbleibenden zwei Kombinationen kein Produkt generieren. Wie Abb. 7 zeigt konnte sowohl bei der Primerkombination putPs/Ks als auch putPas/Kas ein Produkt nachgewiesen werden. Diese entsprechen auch den erwarteten Größen von 2178 und 1511 Basenpaaren. Die verbleibenden Primerkombinationen putPs/Kas und putPas/Ks lieferten erwartungsgemäß kein (bzw. nur ein sehr schwaches unspezifisches) Produkt. Daraus ergibt sich ein spezifisches Orientierungsschema mittels dem die genetische Situation nach Integration der unterbrochenen *Eca4218* Kopie des „suicide-vectors“ ins Genom genau beschrieben werden kann (Abb. 8). Da eine komplette Überprüfung der durch die „K.O.“-Mutagenese betroffenen Bereiche mittels Sequenzierung die zu erwartenden verwendbaren 700 Basenpaare überschreiten würde, mussten die bei den PCR-Reaktionen entstandenen Teilfragmente einzeln sequenziert werden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden kompetente *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* Zellen mit dem als pCU22.1 bezeichneten Konstrukt transformiert. Durch die im Material und Methoden Teil geschilderten Selektionsvorgänge auf Ampicillin und Kanamycin-haltigen Platten konnten vier putative „double crossing-over“ Mutanten isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Diese vier Transformanten zeigten alle Wachstum auf Kanamycin. Nach mehreren Anzuchtversuchen zeigte nur eine dieser vier Mutanten ein Wachstum auf Ampicillin während die verbliebenen drei nicht mehr wuchsen.

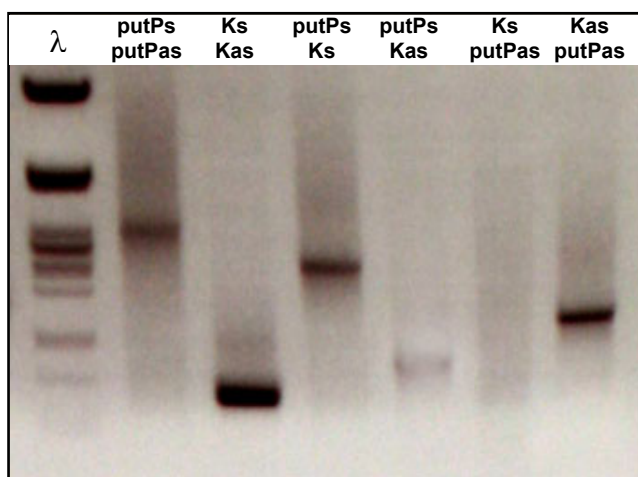


Abb. 7: PCR-Analyse des *Eca4218* (*putP*) „K.O.“-Konstruktes. Gezeigt ist ein Agarosegel auf dem PCR-Reaktionsansätze aufgetragen und aufgetrennt wurden. Die verschiedenen Ansätze beinhalten jeweils unterschiedliche Primer-Paare. Die Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurde das als pCU22.1 bezeichnete Plasmid benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Diese drei putativen Mutanten wurden daraufhin mittels PCR-Analysen genauer untersucht. Mittels des Orientierungsschemas (Abb. 8) können Mutanten die aus einem „double-crossing over“ hervorgegangen sind anhand eines charakteristischen Produkt-

Muster identifiziert werden. Die drei untersuchten Mutanten zeigten hierbei ein identisches Muster (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Untersuchungen mit nur einer dieser Mutanten durchgeführt.

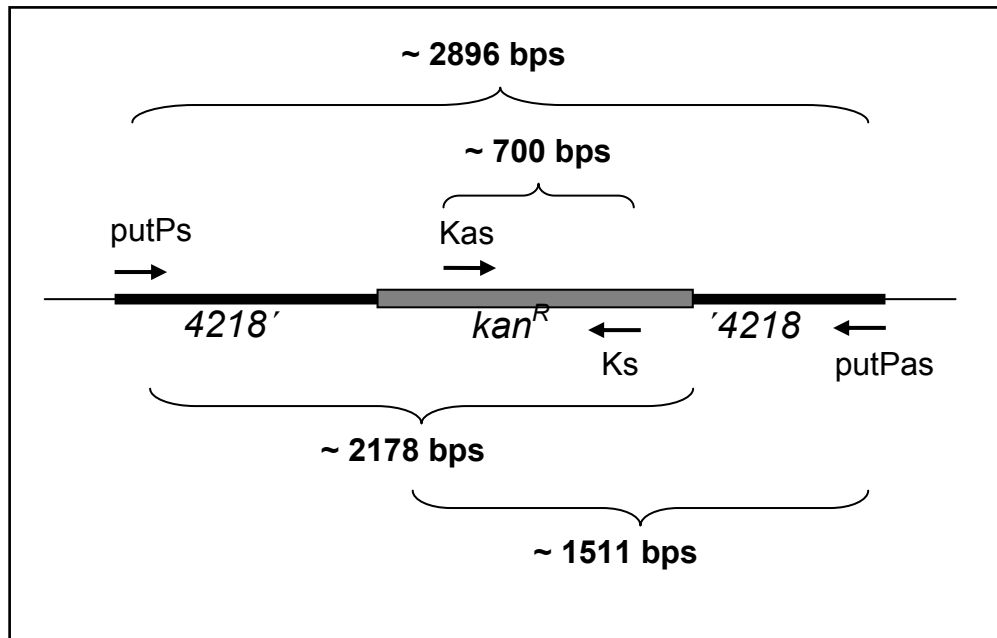


Abb. 8: Orientierungsschema der „K.O.“-Kassette. Gezeigt sind die Orientierungen des *Eca4218* Locus (*putP*) und der Kanamycin-Resistenz Kassette (*kan^R*). Die Bezeichnung der jeweiligen Primer ist oberhalb ihrer durch Pfeile markierten Bindestellen angegeben. Die zu erwartenden PCR-Produkte bei entsprechenden Primer-Paarungen sind durch Klammern gekennzeichnet. Die Länge korrespondierender DNA-Fragmente ist oberhalb der Klammern vermerkt.

Wie in Abb. 9 zu sehen ist, konnte gegenüber dem Wildtypen die „K.O.“-Kassette bestehend aus dem durch die Kanamycin-Resistenz unterbrochenen Gen-Lokus *Eca4218* nachgewiesen werden. Des Weiteren war es auch möglich die Kanamycin-Resistenz selbst nachzuweisen die beim *Eca* Wildtypen nicht vorhanden ist. Auch die Gen/Resistenz spezifischen Primerkombinationen lieferten die erwarteten PCR-Produkte. Somit konnte eine „K.O.“-Mutagenese des Gen-Lokus *Eca4218* als erfolgreich erachtet werden.

Um die korrekte räumliche Lokalisierung der „K.O.“-Kassette nach Rekombination und Insertion hinsichtlich des genetischen Locus zu überprüfen wurde eine weitere PCR-Analyse durchgeführt. Hierbei sollte mittels einer Primerkombination, die aus einem etwa 500 Basenpaare „upstream“ gelegenen Primer und dem passenden Kanamycin-Resistenz Primer (Ks) besteht, die Insertion am korrekten genetischen Locus nachgewiesen werden. Das hierbei amplifizierte Fragment besteht sowohl aus Bereichen, welche nicht Teil der Rekombination waren, als auch Bereichen, die aus dieser hervorgingen. Das Ersetzen des putPs- durch den putPup500s-Primer in der Kombination putPs/Ks bringt hierbei mit sich, dass das entstehende Produkt bei Insertion im korrekten Genlocus nicht bei 2178

Basenpaare (Abb. 9) sondern etwa 500 Basenpaare länger, also ca. 2700 Basenpaare laufen sollte (Vergleiche Mat. & Meth., Kap. 2.1.5.11).

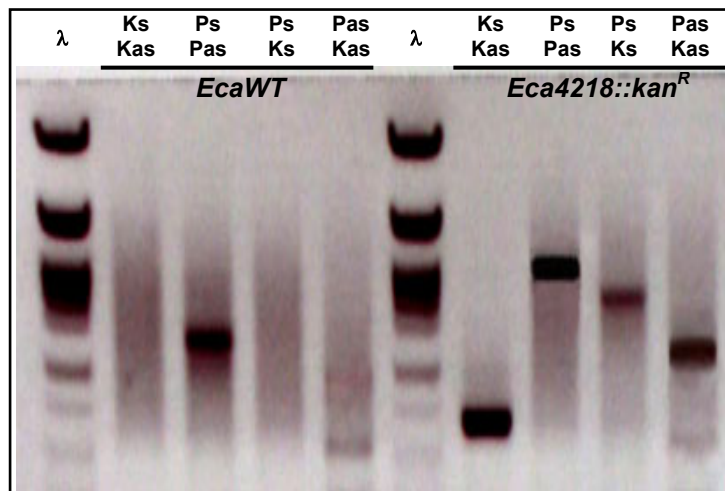


Abb. 9: PCR-Analyse der *Eca4218::kan^R* „K.O.“-Mutante. Gezeigt ist ein Agarosegel mit entsprechenden PCR-Reaktionen. Die benutzten Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurden *Eca*-Wildtyp, als auch *Eca4218::kan^R* Zellen benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Wie erwartet konnte mittels der Primerkombination putPs/Ks ein charakteristisches Produkt von ca. 2200 Basenpaaren amplifiziert werden (Abb. 10). Tatsächlich konnte mittels der neuen Primerkombination putPup500s/Ks ein Produkt amplifiziert werden, welches um 500 Basenpaare größer erschien als jenes mit der vorangegangenen Kombination (Abb. 10). Dies und das Vorhandensein der „K.O.“-Kassette zeigt, dass die *Eca4218* Gensequenz unterbrochen wurde und dass die durch homologe Rekombination erfolgte Insertion ins Genom am richtigen Genlokus erfolgte.

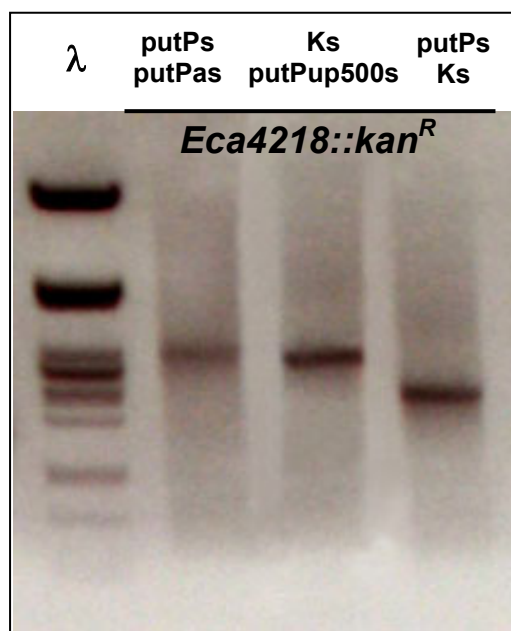


Abb. 10: Überprüfung des Genlokus bei der *Eca4218* Insertionsmutante. Gezeigt ist ein Agarosegel mit entsprechenden PCR-Reaktionen. Die verwendeten Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurden *Eca4218::kan^R* Zellen benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Um zu zeigen, dass die hier beschriebene *Eca* Mutante (*Eca4218::Kan^R*) defizient in der Expression des *Eca4218*-Genes ist, wurde eine „Northern-Blot“ Analyse durchgeführt.

Hierbei wird davon ausgegangen, dass durch die Insertion in der *Eca4218* Gensequenz eine funktionelle Expression unterbunden wird und dadurch kein Transkript nachgewiesen werden kann. Des Weiteren sollte jedoch Transkript des Kanamycin-Resistenzgenes vorliegen.

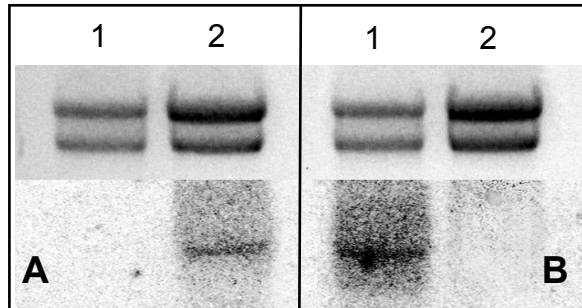


Abb. 11: Northern-Blot Analyse zum Nachweis der *Eca4218* und Kanamycin-Resistenz Transkripte.

A) Expressionsnachweis des Kanamycin-Resistenz Genes. Gezeigt ist die rRNA Beladungskontrolle (oberhalb) und die Detektion entsprechender Transkripte (unterhalb). B) Expressionsnachweis des *Eca4218* Transkriptes. Geltend für A) und B) ist folgende Beladung, 1 = *EcaWT*; 2 = *Eca4218::kan^R*

Tatsächlich konnte kein Transkript für die *Eca4218*-Gensequenz bei der entsprechenden Mutante nachgewiesen werden (Abb. 10 B2). Im Gegensatz dazu war jedoch ein klares Signal und damit Transkript für dieses Gen beim *Eca* Wildtypen nachzuweisen. Bezüglich der Expression des Kanamycin-Resistenzgenes konnte gezeigt werden, dass diese nur bei der *Eca4218::kan^R*-Mutante vorzufinden ist. Beim *Erwinia*-Wildtypen war dagegen eine solche nicht zu beobachten. Somit konnte mittels der durchgeführten molekularen Charakterisierung klar gezeigt werden, dass die hergestellte *Erwinia*-Mutante defizient für die Expression des Genes *Eca4218* ist. Dieses bedingt durch die Insertion der Resistenz-Kassette und folglich der Unterbrechung der kodierenden Sequenz.

3.1.1.2 Biochemische Charakterisierung

Neben der molekularen Charakterisierung der *Eca4218::kan^R* Mutante, welche vor allem Untersuchungen von DNA- respektive RNA-Sequenzen beinhaltet, werden bei einer biochemischen Charakterisierung die Eigenschaften des Transportproteines selbst näher untersucht. Vor allem die Transporteigenschaften sollen bei einer solchen Charakterisierung beschrieben werden.

Zu diesem Zweck werden mittels heterologer Expressionssysteme (z.B. *E.coli*, *S.cerevisiae*) die kodierenden Bereiche der zu untersuchenden Gene zu Proteinen synthetisiert und diese auf ihre Funktion hin untersucht.

Für die biochemische Charakterisierung eines solchen Proteins im heterologen *E.coli*-System, ist eine funktionelle Integration in die bakterielle Cytoplasmamembran notwendig. Um dies zu überprüfen wurde der kodierende DNA-Bereich des *Eca4218* Genes „in-frame“ in einen pET16b-Vektor eingebracht und dieser in *E.coli* BLR Zellen transformiert. Mittels dieser Komponenten wurde wie unter 2.2.4. beschriebenen vorgegangen. Zur Ermittlung

der Lokalisierung und der Integration des ECA4218-Proteins wurde eine „SDS-PAGE“ (Kap. 2.2.2), gefolgt von einem „Western-Blot“ (Kap. 2.2.3) mit *E.coli*-Membran Fraktionen durchgeführt. Durch das benutzte pET16b-Konstrukt (mit „His- Tag“) wird eine Visualisierung mittels Anti-His-Antikörper ermöglicht.

Es gelang jedoch nicht mittels des eingebrachten Plasmid, welches die kodierende *Eca4218* Gensequenz enthielt, eine funktionelle Insertion in die *E.coli*-Plasmamembran nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Um dennoch biochemische Informationen über die Funktion des ECA4218 Proteins zu bekommen, wurde versucht, analog zum *E.coli*-System, Transportstudien an intakten Erwinien-Zellen durchzuführen. Da es sich bei dem zu untersuchenden Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Natrium gekoppelten Prolin-Transporter handelt, wurden Versuche mit Prolin als Aufnahmesubstrat durchgeführt. Zwar zeigte der *Erwinia*-Wildtyp zeitabhängige Prolinaufnahmen, ebenso waren jedoch absolut identische Aufnahmewerte für die *Eca4218* Insertionsmutante zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Ein eindeutiger Unterschied in den Aufnahmezeiten zwischen Wildtyp und Mutante hätte weitere Experimente ermöglicht, da dieser Unterschied auf das Fehlen eines funktionellen ECA4218 Proteins zurückzuführen gewesen wäre. Da dies jedoch nicht der Fall war, *Eca* zudem weitere Prolin-Aufnahmesysteme besitzt und die gemessenen Aufnahmen offensichtlich nicht auf das ECA4218 Protein zurückgeführt werden können, wurde eine biochemische Charakterisierung nicht weiterverfolgt.

3.1.1.3 Phytopathologische Charakterisierung

Ergänzend zu den bisher durchgeführten molekularen und biochemischen Untersuchungen sollen in diesem Teil die phytopathologischen Eigenschaften der betrachteten Mutante beurteilt werden. Da es sich bei *Eca* um ein phytopathogenes Bakterium handelt ist es von großem Interesse die Auswirkungen des fehlenden Genproduktes auf die Virulenz von *Erwinia* zu untersuchen. Hierzu bieten sich die unter Kap. 2.3.5 und 2.3.1 ff. beschriebenen Untersuchungen der pektolytischen Aktivität an.

Eine schnelle, wenn auch nicht zwangsläufig der *in-vivo* Situation entsprechende Aussage, konnte mit PEC-Platten erzielt werden (Kap. 2.3.5). Hierbei stellte sich heraus, dass die Fähigkeit Polypektat durch die Aktivität ausgeschiedener pektolytischer Enzyme in Oligomere zu zersetzen keine signifikanten Veränderungen zwischen Wildtyp und Mutante aufwies. Wie in Abb. 12 zu sehen ist konnte nur eine leichte Tendenz zu einem kleineren Lysehof (visualisierbar durch Ruthenium-Rot Gegenfärbung) festgestellt werden. Trotzdem sind auch solche kleinen Veränderungen hinsichtlich des Lysehofes zu beachten, da eine räumlich uniforme Ausbreitung der lytischen Enzyme vorliegt. Dies bedingt, dass die

Ausscheidung und die Wirkung der entsprechenden Enzyme dem Volumen einer Kugel mit korrespondierendem Radius entsprechen. Deshalb vergrößert sich der eigentliche Aktivitätsraum der pektolytischen Enzyme beispielsweise bei einer Verdoppelung des Lysehof-Radius um den Faktor acht.

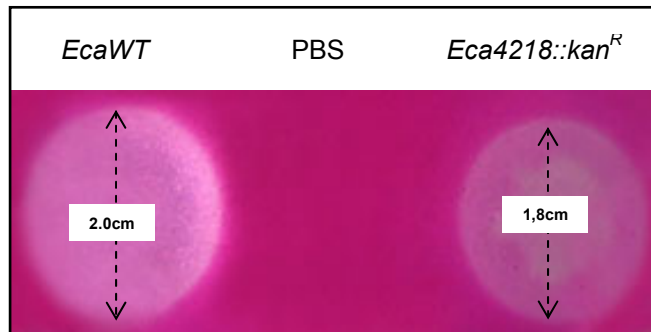


Abb. 12: Nachweis der pektolytischen Aktivität mittels PEC-Platten. Gezeigt ist ein Plattentest der die pektolytische Aktivität von jeweils 5 μ l einer Bakteriensuspension nach Gegenfärbung mit Ruthenium-Rot zeigt. Die jeweilige Bakteriensuspension geht aus der Beschriftung oberhalb hervor. Angegeben ist der Durchmesser des Lysehofes in cm.

Entsprechend der oben beschriebenen Berechnung ergibt sich also für den *Erwinia* Wildtypen ein Aktivitätsraum von 4,18 cm^3 und für die untersuchte Insertionsmutante dem entsprechend 3,05 cm^3 . Da jedoch wie bereits erwähnt, das System nicht unbedingt der *in-vivo* Situation entspricht, wurden weitere Tests an Kartoffeln mittels Knollenscheibchen-Inokulationen vorgenommen.

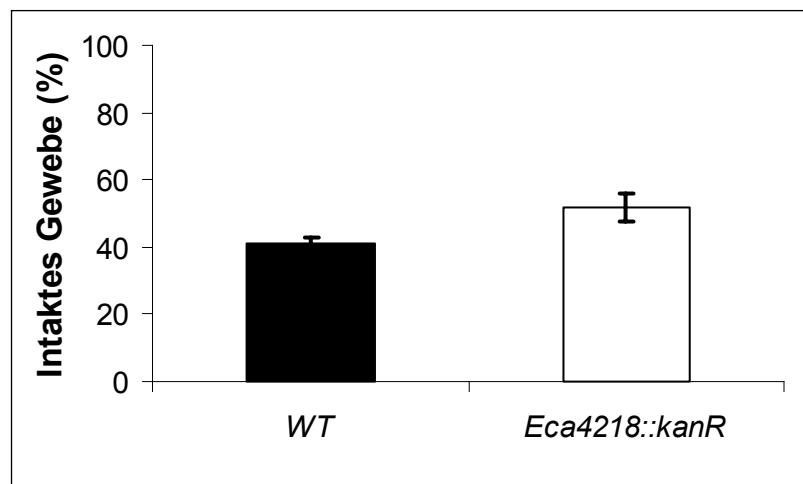


Abb. 13: Quantifizierung des durch Erwinien mazerierten Gewebes mittels Knollenscheibchentests. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt.

Wie Abb. 13 zeigt konnte auch mittels Knollenscheibchentests nur eine leichte Tendenz zu einem schwächeren Befall festgestellt werden. So blieb nach Inokulation von Wildtyp Knollenscheibchen mit Wildtyp *Erwinien* 41 ± 1,7 Prozent intaktes Gewebe zurück. Bei Inokulationen mit der *Eca4218::kanR* Insertionsmutante belief sich der Anteil an intaktem Gewebe nach Mazeration auf 51 ± 4,1 Prozent. Folglich zeigten die durchgeführten Knollenscheibchen Experimente keinen signifikanten Unterschied in der Mazeration durch den *Erwinia* Wildtypen und die *Eca4218*-Insertionsmutante.

Da zumindest ein geringer Unterschied zwischen den beiden *Erwinia*-Stämmen zu beobachten war, wurde des Weiteren versucht dies mittels Veränderungen der Umgebungsbedingungen zu verstärken. Ausgehend von der sequenzbedingten Einordnung des ECA4218 Proteins als putativer Prolintransporter, wurden Infiltrationsversuche mit verschiedenen Konzentrationen an Prolin mit Wildtypkartoffelknollen durchgeführt.

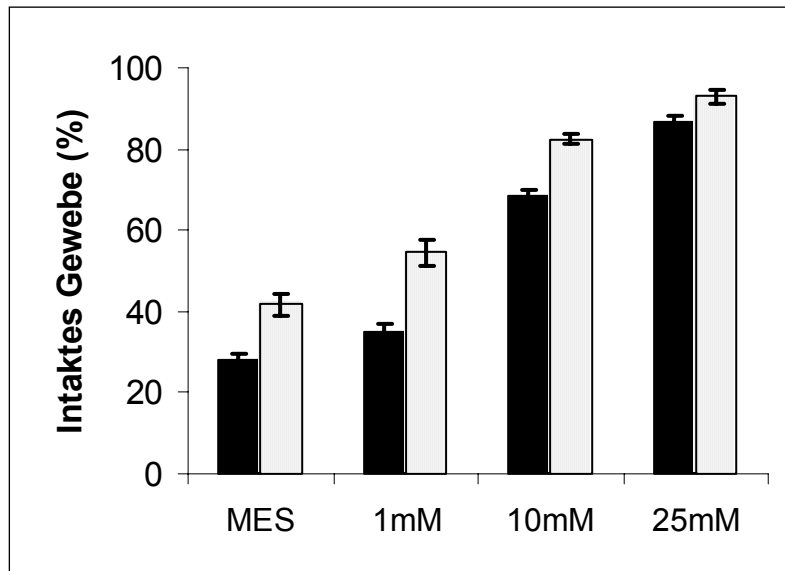


Abb. 14: Quantifizierung des durch *Erwinien* mazerierten Gewebes mittels Tests an infiltrierten Knollenscheibchen. Die bei der Infiltration verwendeten Prolin-konzentrationen sind unter den jeweiligen Balken vermerkt. Die Werte sind aus vier unabhängigen Versuchen gemittelt und mit den Standardabweichungen versehen. In schwarz dargestellt, ist der *Erwinia* Wildtyp, gepunktete Balken sind der *Eca4218::kan^R* Mutante zuzuordnen.

Diese Versuche zeigten zum Einen, dass eine sukzessive Erhöhung der apoplastischen Prolinkonzentration zu einer verminderten Mazeration des Gewebes führt, zum Anderen war eine differentielle Auswirkung auf Wildtyp und Insertionsmutante jedoch nicht feststellbar (Abb. 14). Dabei führte eine Infiltration von 10mM Prolin zu einer Halbierung der Gewebemazeration. Weiterhin konnte der ohnehin schon geringe Unterschied bezüglich Virulenz der Insertionsmutante durch Applizieren steigender Prolinkonzentrationen deutlich verkleinert werden. So war schließlich bei einer Infiltration von 25mM Prolin kein Unterschied mehr zu erkennen.

3.1.2 ECA3503; ein System zur Aufnahme osmotische aktiver Substanzen

In der Gruppe der Enterobakterien wird bisher von drei Aufnahmesystemen für Prolin und die verwandten Substanzen Betain und Glycin-Betain ausgegangen. Diese Redundanz an Transportsystemen erschwert deutlich die Einschätzung der Bedeutung einzelner Transporter, beispielsweise bei der Pathogenese von *Eca*. Da jedoch wie weiter oben gezeigt, die publizierten „MicroArray“-Analysen (Okinaka *et al.*, 2002) und Infiltrationsversuche (Abb. 14) auf einen Einfluss von Prolin auf die Virulenz von *Erwinia*

gegenüber Knollenscheibchen hindeuten, wurde versucht ein weiteres Prolin-Aufnahmesystem zu charakterisieren.

3.1.2.1 Molekulare Charakterisierung

Der Genlokus *Eca3503* kodiert für ein Protein, welches als Homolog des bei Enterobakterien, insbesondere bei *E.coli*, sehr gut charakterisierten Prolin/Glycin-Betain transportierenden Osmosensor ProW angegeben wird. Dieser Gen-Lokus wurde als nächstes Ziel einer Insertionsmutagenese zur Herstellung einer weiteren „K.O.“-Mutante ausgewählt. Hierzu wurde wiederum ein „K.O.“-Konstrukt benötigt (pCU47.1). Wie bereits beschrieben erfolgten zur Ermittlung von Abfolge und Orientierung der entsprechenden DNA-Bereiche, PCR-Reaktionen mit verschiedenen charakteristischen Primerpaaren (Abb. 15). Mittels einer Gen-spezifischen Primerkombination (proWs/proWas) war die Insertion der Kanamycin-Resistenz Kassette und somit die Unterbrechung des Genes klar zu erkennen (Abb. 15). Hierbei konnte ein Fragment von ca. 2681 Basenpaaren amplifiziert werden (Vergleiche Abb. 16). Der Resistenzmarker selbst konnte nochmals mittels den Resistenz-spezifischen Primern (Ks/Kas) nachgewiesen werden.

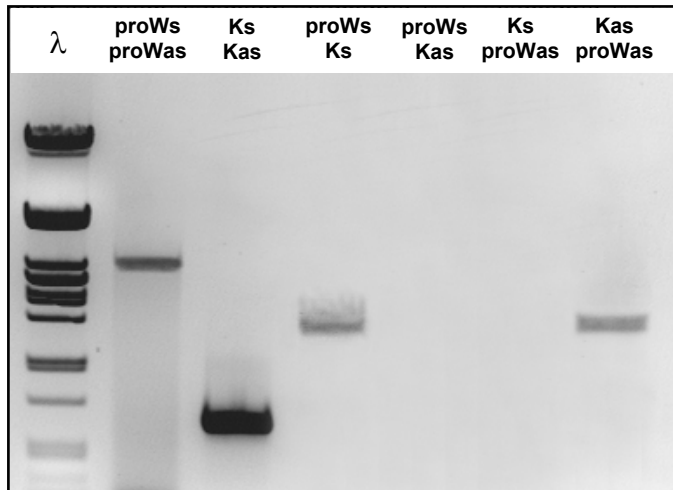


Abb. 15: PCR-Analyse des *Eca3503* (*proW*) „K.O.“-Konstruktes. Gezeigt ist ein Agarosegel auf dem PCR-Reaktionsansätze aufgetragen und aufgetrennt wurden. Die verschiedenen Ansätze beinhalten jeweils unterschiedliche Primer-Paare. Die Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurde pCU47.1 Plasmid DNA benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Da auch hier zwei mögliche Orientierungen der Insertion in der kodierenden DNA-Sequenz vorliegen können, mussten PCR-Analysen mit den vier möglichen Primerpaarungen die sich aus jeweils einem Gen-spezifischen und einem Resistenz-spezifischen Primer ergeben, durchgeführt werden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass jeweils zwei dieser Paarungen charakteristisch für eine korrespondierende Orientierung der Kanamycin-Insertion sind. Daraus folgend sollten die verbleibenden zwei Kombinationen kein Produkt generieren. Wie in Abb. 15 zu sehen ist, konnte sowohl bei der Primerkombination proWs/Ks als auch proWas/Kas ein Produkt perzipiert werden. Die

amplifizierten Fragmente entsprachen auch den erwarteten Größen von 1683 und 1597 Basenpaaren. Die verbleibenden Primerkombinationen proWs/Kas und proWas/Ks lieferten erwartungsgemäß kein Produkt. Hieraus wurde das in Abb. 16 gezeigte Orientierungsschema geschlussfolgert. Als Kontrolle wurden die bei der PCR erzeugten Amplifikate mittels Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

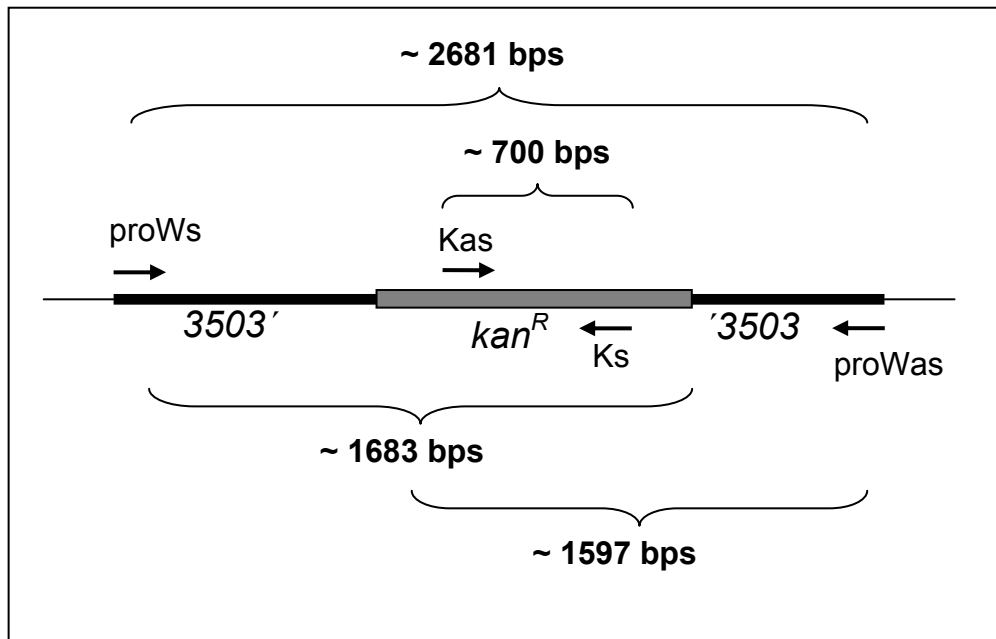


Abb. 16: Orientierungsschema der „K.O.“-Kassette. Gezeigt sind die Orientierungen des *Eca3503* Lokus (*proW*) und der Kanamycin-Resistenz Kassette (*kan^R*). Die Bezeichnung der jeweiligen Primer ist oberhalb ihrer durch Pfeile markierten Bindestellen angegeben. Die zu erwartenden PCR-Produkte bei entsprechenden Primer-Paarungen sind durch Klammern gekennzeichnet. Die Länge korrespondierender DNA-Fragmente ist oberhalb der Klammern vermerkt.

Bei der im Anschluss durchgeführten Transformation wurden kompetente *Eca* Zellen mit dem als pCU47.1 bezeichneten Konstrukt transformiert. Hierbei konnten fünfzehn putative „K.O.“-Mutanten isoliert werden. Nach Selektion auf Ampicillin und Kanamycin verblieben zwölf dieser fünfzehn als Insertionsmutanten nach „double crossing-over“ (Daten nicht gezeigt). Diese zwölf Transformanten zeigten alle Wachstum auf Kanamycin jedoch nicht auf Ampicillin. Die restlichen drei zeigten jeweils ein Restwachstum auf Ampicillin und wurden daher bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt.

Die zwölf Mutanten die aus den Antibiotika-„Screenings“ hervorgingen wurden weiteren PCR-Analysen unterzogen. Mittels des Orientierungsschemas (Abb. 16) konnte wiederum ein charakteristisches Produkt-Muster als Referenz zur Bestätigung von Insertionsmutanten benutzt werden. Alle zwölf untersuchten Mutanten zeigten hierbei identische Muster (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Analysen wird daher nur eine dieser Mutanten beschrieben.

Wie Abb. 17 zeigt, bestätigten PCR-Analysen das Ausknocken des *Eca3503* Lokus. So konnte mittels der Gen-spezifischen Primer (proWs/proWas) die „K.O.“-Kassette bestehend aus dem unterbrochenen Gen-Lokus *Eca3503* nachgewiesen werden. Die gleiche Primerkombination führte beim *Erwinia* Wildtypen zur Amplifikation des intakten *Eca3503* Genes. Des Weiteren wurde die Kanamycin-Resistenz durch Resistenz-spezifische Primer nur bei der Mutante nachgewiesen. Eine Reaktion mit Wildtyp-Zellen führte zu keinem Produkt mit diesen Primern. Auch die Gen/Resistenz-spezifischen Primerkombinationen lieferten beim Wildtypen keine Produkte. Dagegen konnten mit diesen charakteristischen Kombinationen die erwarteten PCR-Produkte bei der Mutante amplifiziert werden. Folglich wurde auch für die *Eca3503* Sequenz, erfolgreich eine „K.O.“-Mutagenese durchgeführt.

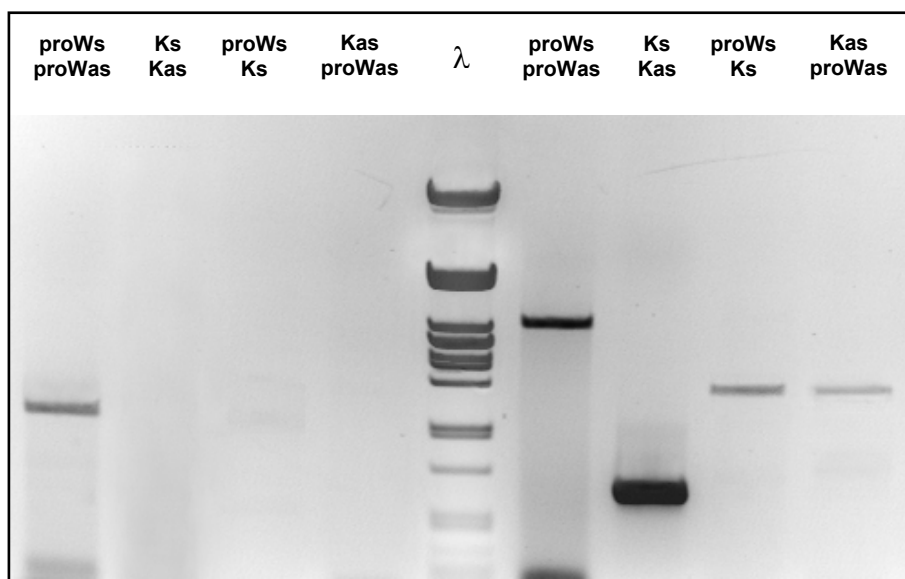


Abb. 17: PCR-Analyse der *Eca3503::kan^R* „K.O.“-Mutante. Gezeigt ist ein Agarosegel mit entsprechenden Reaktionsansätzen. Die benutzten Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurden *Eca*-Wildtyp als auch *Eca3503::kan^R* Zellen benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Da diese Mutante erst zum Schluss der hier vorliegenden Arbeit fertig gestellt wurde, konnte bisher noch keine PCR-Analyse zur Überprüfung von räumlicher Lokalisierung nach Rekombination wie im vorangegangenen Falle durchgeführt werden.

3.1.2.2 Biochemische Charakterisierung

Da die weiter oben beschriebene Charakterisierung des ECA4218 Proteins im heterologen *E.coli* System keine Aussage zuließ, wurde die Herangehensweise für das ECA3503 Protein modifiziert. Des Weiteren sollte durch die ausgedehnte Ähnlichkeit auf Proteinsequenz-Ebene eine abweichende Funktion von dem bereits charakterisierten ProW

Homolog aus *E.coli* weitgehend ausgeschlossen sein. Deshalb wurde versucht direkte Aufnahmeversuche mit radioaktiv markiertem Prolin an Erwinien-Zellen durchzuführen. Die Transportversuche an intakten Wildtyp- und Mutanten-Zellen zeigten hierbei jedoch nur geringe Unterschiede in der Prolin-Aufnahme (Daten nicht gezeigt). Die bisher durchgeführten biochemischen Untersuchungen an zwei von drei beschriebenen Aufnahmesystemen führten zu keinem greifbaren Unterschied der untersuchten Mutanten gegenüber dem *Eca* Wildtypen. Da in letzter Konsequenz weitere Analysen die Herstellung von multiplen „K.O.“-Mutanten - welche schwer und aufwendig sind- erfordern, wurde die biochemische Charakterisierung des Prolin-Transportes in *Eca* an dieser Stelle abgebrochen.

3.1.2.3 Phytopathologische Charakterisierung

Wenn auch kein Aufschluss über die biochemische Funktion des ECA3503 Proteins gewonnen werden konnte, so ist die Ermittlung der phytopathologischen Eigenschaften dennoch interessant und möglicherweise durchaus von Bedeutung. Eine schnelle Überprüfung dieser Eigenschaften wurde mittels PEC-Platten durchgeführt (Kap. 2.3.5). Dabei führte ein nicht-funktionelles *Eca3503*-Gen zu einer erhöhten pektolytischen Aktivität der *Eca3503::kan^R* Mutante gegenüber dem Wildtypen. Wie Abb. 18 zeigt, konnte ein Lysehof –Durchmesser von 1,6 cm für den *Erwinia* Wildtypen ermittelt werden. Die erzeugte Insertionsmutante verursachte dagegen eine Lysehof von 2 cm Durchmesser.

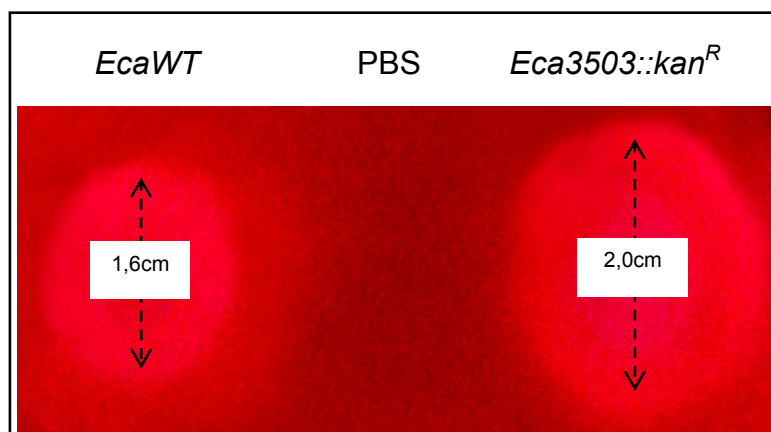


Abb. 18: Nachweis der pektolytischen Aktivität mittels PEC-Platten. Gezeigt ist ein Plattentest der die pektolytische Aktivität von jeweils 5µl einer Bakteriensuspension nach Gegenfärbung mit Ruthenium-Rot zeigt. Entsprechende Bakterien sind in der Beschriftung oberhalb vermerkt. Angegeben ist der Durchmesser des Lysehofes in cm.

Nach dem oben aufgestellten (Kap. 3.1.1.3) Modell einer räumlich uniformen Ausbreitung der lytischen Enzyme, wurde der Aktivitätsraum berechnet. Hierbei ergab sich für den Wildtypen ein Aktivitätsraum von 2,14 cm³ und für die untersuchte Insertionsmutante 4,18 cm³. Dies spricht für eine erhöhte pektolytische Aktivität die zumindest auf PEC-Platten nachgewiesen werden kann.

Um das ermittelte Ergebnis hinsichtlich der *in-vivo* Situation zu bestätigen, wurde auf Knollenscheibchenversuche zurückgegriffen.

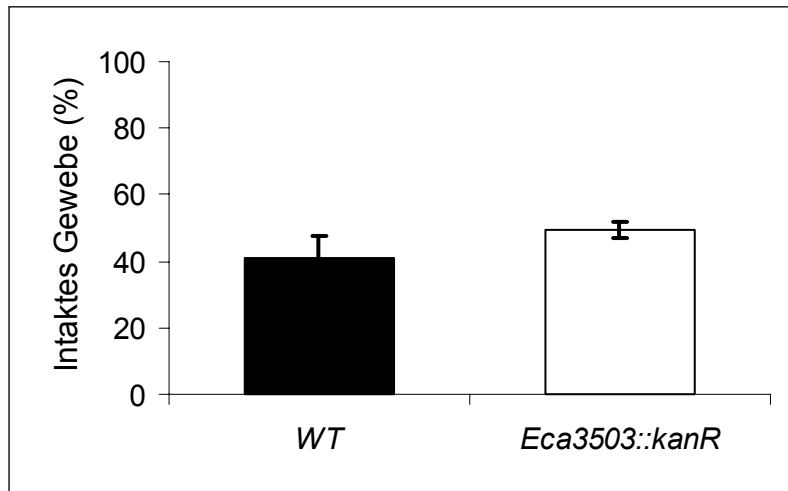


Abb. 19: Quantifizierung des durch Erwinien mazerierten Gewebes mittels Knollenscheibchentests. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den jeweiligen Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt.

Hierbei zeigte sich, dass entgegen der auf PEC-Platten stärkeren pektolytischen Aktivität der *Eca3503::kan^R* Mutante ein solcher Unterschied bei Knollenscheibchen Experimenten nicht zu beobachten war (Abb. 19). Obwohl also durch die *in-vitro* Tests eine möglicherweise erhöhte Virulenz zu erwarten gewesen wäre, wurde dies durch *in-vivo* Tests nicht bestätigt. So blieb nach Inokulation von Wildtyp Knollenscheibchen mit Wildtyp Erwinien 41±6,7 Prozent intaktes Gewebe zurück. Bei Inokulationen mit der *Eca3503::kan^R* Insertionsmutante belief sich der Anteil an intaktem Gewebe nach Mazeration auf 49±2,4 Prozent. Dementsprechend offenbarten die durchgeführten Knollenscheibchen Experimente keine signifikanten Unterschiede zwischen dem *Erwinia* Wildtypen und der Insertionsmutante, stimmten jedoch nicht mit den PEC-Platten Versuchen bei denen eine höhere pektolytische Aktivität festgestellt wurde, (Abb. 19) überein.

3.2 Untersuchungen zur d-Galaktonataufnahme und deren Bedeutung für die Virulenz anhand von *Eca* „K.O.“-Mutanten

Der Abbau der pflanzlichen Zellwand und die damit verbundene Auflösung des Zellverbundes gehen einher mit dem Verlust einer schützenden Barriere. Hierbei wird die Gesamtheit der bis dahin vorhandenen Metabolite frei und steht *Erwinia* zum Antreiben des eigenen Stoffwechsels zur Verfügung. Die beim Zellwand-Abbau frei gewordenen Galakturonsäuren; die in den meisten Fällen als Dimere, Trimere oder Tetramere vorliegen können von *Erwinia* als C-Quelle benutzt werden (Hugouvieux-Cotte-Pattat & Reverchon, 2001; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2001). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass *Erwinia chrysanthemi* ein Aufnahmesystem für die erwähnten Oligo-Galakturonsäuren besitzt,

welches spezifisch beim Befall von Wirtspflanzen induziert wird (Hugouvieux-Cotte-Pattat & Reverchon, 2001; Okinaka *et al.*, 2002). Neben diesen Galakturonaten werden aber auch Galaktonate frei. Diese Moleküle stehen in enger Verbindung, da beide durch eine Enzymreaktion in einander umgewandelt werden können. Interessanterweise konnte abermals bei *Erwinia chrysanthemi* durch „MicroArray“-Analysen gezeigt werden, dass ebenfalls ein putativer d-Galaktonat Transporter spezifisch bei Befall von Chrysanthemen induziert wird (Okinaka *et al.*, 2002).

Dies spricht dafür, die Bedeutung dieses System zur möglichen Aufnahme von Galaktonaten bei der Pathogenese von *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* auf Kartoffelknollen zu ermitteln. Hierzu sollte wiederum anhand von „K.O.“-Mutanten die Virulenz bei Verlust eines funktionellen Genproduktes ermittelt und mit dem Wildtypen verglichen werden. Weiterhin soll versucht werden die Funktion dieses Transporters herauszufinden und mögliche Schlüsse hinsichtlich des bakteriellen Stoffwechsels zu ziehen.

3.2.1 Molekulare Charakterisierung

Wie bereits erwähnt sollte eine Insertionsmutante für den Genlokus *Eca4415* hergestellt werden. Als erster Schritt wurde hierzu ein entsprechendes „K.O.“-Konstrukt hergestellt (pCU24.1). Die Ermittlung von Abfolge und Orientierung der entsprechenden DNA-Bereiche erfolgt mittels PCR ausgehend von verschiedenen charakteristischen Primerpaaren (Abb. 20).

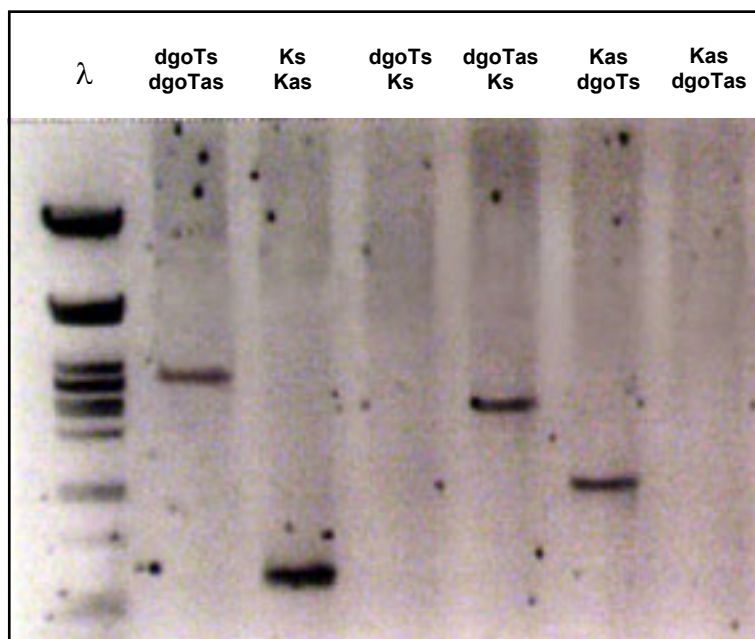


Abb. 20: PCR-Analyse des *Eca4415* (*dgoT*) „K.O.“-Konstruktes. Gezeigt ist ein Agarosegel auf dem PCR-Reaktionsansätze aufgetragen und aufgetrennt wurden. Die jeweiligen Ansätze beinhalten verschiedene Primer-Paare. Die Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurde das als pCU24.1 bezeichnete Plasmid benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Mittels der Gen-spezifischen Primerkombination (dgoTs/dgoTas) konnte die Insertion der Kanamycin-Resistenz Kassette und somit die Unterbrechung des Genes klar

nachgewiesen werden (Abb. 20). Hierbei konnte ein Fragment von ungefähr 2776 Basenpaaren amplifiziert werden (Vergleiche Abb. 21). Der Resistenzmarker selbst konnte nochmals mittels den Resistenz-spezifischen Primern (Ks/Kas) nachgewiesen werden.

Die zwei möglichen Orientierungen, die bei Insertion des Resistenzmarkers vorliegen können, wurden mittels den vier möglichen Primerpaarungen, die sich aus jeweils einem Gen- und einem Resistenz-spezifischen Primer ergeben, auf die in diesem Fall zutreffenden beschränkt. Hierbei konnte jeweils bei zwei dieser Paarungen ein charakteristisches PCR-Produkt nachgewiesen werden, wohingegen die verbleibenden zwei kein Produkt lieferten. So zeigt Abb. 20, dass sowohl bei der Primerkombination dgoTs/Kas als auch dgoTas/Ks ein Produkt identifiziert werden konnte. Die amplifizierten Fragmente entsprachen mit 1348 und 2327 Basenpaaren ebenfalls den erwarteten Größen. Die verbleibenden Primerkombinationen dgoTs/Ks und dgoTas/Kas lieferten erwartungsgemäß kein Produkt. Hieraus wurde das in Abb. 21 gezeigte Orientierungsschema abgeleitet. Als Kontrolle wurden die bei der PCR erzeugten Amplifikate mittels Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

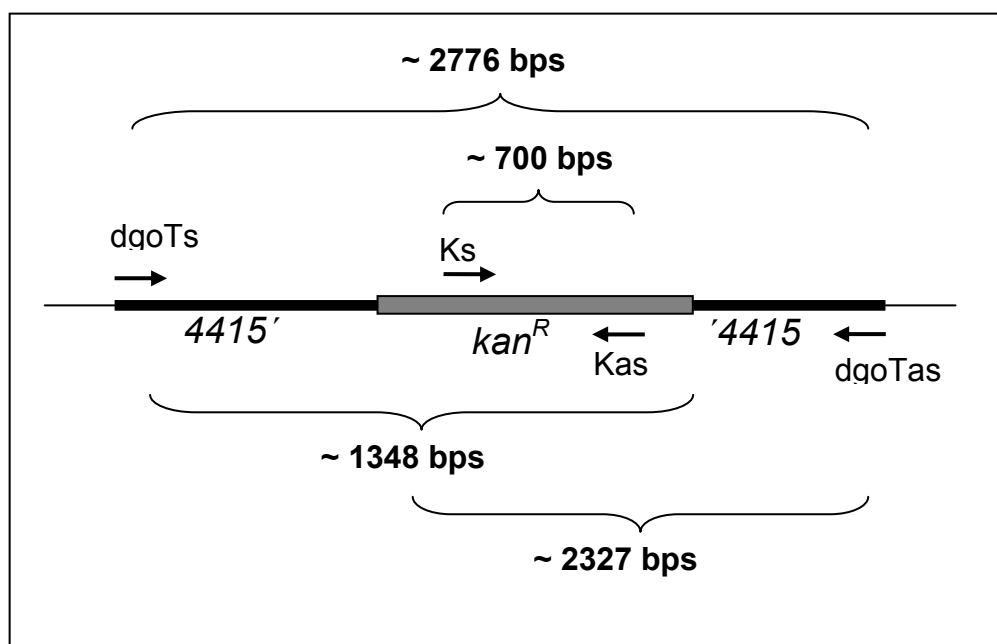


Abb. 21: Orientierungsschema der „K.O.“-Kassette. Gezeigt sind die Orientierungen des *Eca4415* Locus (*dgoT*) und der Kanamycin-Resistenz Kassette (*kan^R*). Die Bezeichnung der jeweiligen Primer ist oberhalb ihrer durch Pfeile markierten Bindestellen angegeben. Die zu erwartenden PCR-Produkte bei entsprechenden Primer-Paarungen sind durch Klammern gekennzeichnet. Die Länge korrespondierender DNA-Fragmente ist oberhalb der Klammern vermerkt.

Durch die Transformation von kompetenten *Eca* Zellen mit dem als pCU24.1 bezeichneten Konstrukt konnten zwei putative „K.O.“-Mutanten isoliert werden. Diese wurden nach Selektion auf Ampicillin und Kanamycin als Insertionsmutanten, die aus einem „double

crossing-over“ hervorgingen, verifiziert (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend zeigten Sie ein Wachstum auf Kanamycin jedoch nicht auf Ampicillin. Die erhaltenen *Eca4415* Insertionsmutanten wurden zwecks Bestätigung weiteren PCR-Analysen unterzogen. Mittels des Orientierungsschemas (Abb. 21) konnte wiederum auf ein charakteristisches Produkt-Muster als Referenz zur Bestätigung zurückgegriffen werden. Beide Mutanten zeigten hierbei ein erwartetes einheitliches Muster (Daten nicht gezeigt).

Wie Abb. 22 zeigt, bestätigten PCR-Analysen das „Ausknocken“ des *Eca4415* Lokus. So konnte mittels der Gen-spezifischen Primer (dgoTs/dgoTas) die um die Resistenz-Kassette verlängerte kodierende *Eca4415*-Sequenz nachgewiesen werden. Die gleiche Primerkombination führte beim *Erwinia* Wildtypen zur Amplifikation des intakten *Eca4415* Genes. Auch, die Kanamycin-Resistenz konnte mittels den Resistenz-spezifischen Primern bei der Mutante amplifiziert werden. Eine Reaktion mit Wildtyp-Zellen führte dagegen zu keinem Produkt. Auch die Gen/Resistenz spezifischen Primerkombinationen lieferten beim Wildtypen keine Produkte. Dagegen konnten mit diesen charakteristischen Kombinationen die erwarteten PCR-Produkte bei der Mutante nachgewiesen werden. Folglich wurde auch für die *Eca4415* Sequenz eine erfolgreiche „K.O.“-Mutagenese durchgeführt.

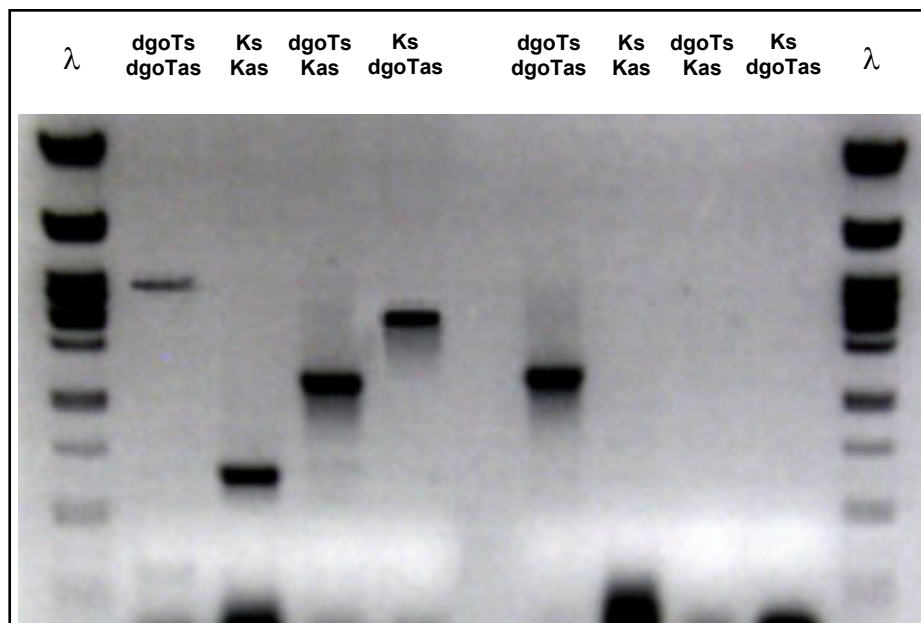


Abb. 22: PCR-Analyse der *Eca4415::kan^R* „K.O.“-Mutante. Gezeigt ist ein Agarosegel mit entsprechenden Reaktionsansätzen. Die benutzten Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurden *Eca*-Wildtyp als auch *Eca4415::kan^R* Zellen benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Zur Überprüfung der Rekombination hinsichtlich des korrekten Genlokus, wurde eine weitere PCR-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde wie bei der *Eca4415::kan^R* Mutante vorgegangen und ein ungefähr 500 Basenpaare „upstream“ des Start-ATG gelegener Primer

mit dem passenden Kanamycin-Resistenz Primer (Kas) kombiniert. Das entstandene Produkt lief auf einer ungefähren Größe von 1867 Basenpaaren und wies damit die erwartete Verlängerung gegenüber der charakteristischen Primerkombination (dgoTs/Kas) auf.

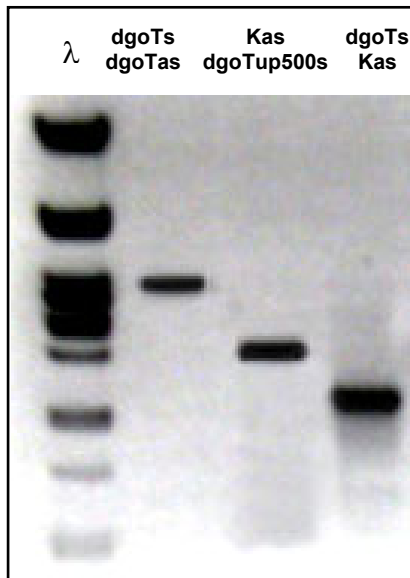


Abb. 23: Überprüfung des Genlokus bei der *Eca4415* Insertionsmutante. Gezeigt ist ein Agarosegel mit entsprechenden PCR-Reaktionen. Die benutzten Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt. Als Template wurden *Eca4415::kan^R* Zellen benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λ DNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Analog zu den unter Kap. 3.1.1.1 gezeigten Experimenten konnte auch für die *Eca4415* Gensequenz hiermit gezeigt werden, dass diese am richtigen Locus nach homologer Rekombination unterbrochen wurde.

3.2.2 Biochemische Charakterisierung

Eine biochemische Charakterisierung des ECA4415 Proteins wurde nicht angegangen da die putativen Substrate wie z.B. Galakturon-Oligomere oder auch Galaktonat nicht als radioaktiv markiertes Substrat zu erhalten sind. Diese Moleküle müssten durch aufwendige Ansätze selbst radioaktiv markiert und synthetisiert werden, was jedoch der zeitliche Rahmen dieser Arbeit nicht zuließ. Aus diesen Gründen wurde die biochemische Charakterisierung nicht weiter verfolgt.

3.2.3 Phytopathologische Charakterisierung

Eine Untersuchung der phytopathologischen Eigenschaften erscheint für diese Mutante als überaus interessant, da das putative Substrat ein direktes Produkt des Zellabbaues darstellt. Um eine erste Überprüfung der pektolytischen Aktivität vorzunehmen wurde auf die unter 2.3.5 beschriebenen PEC-Platten zurückgegriffen. Da für den *Eca4415*

Genlokus nur zwei „K.O.“-Mutanten erzeugt werden konnten, wurden alle folgenden Analysen mit beiden Mutanten simultan durchgeführt. Da sich beide erwartungsgemäß exakt gleich verhielten, wird jedoch immer nur eine als repräsentatives Beispiel gezeigt. So zeigte die *Eca4415* Insertionsmutante auf PEC-Platten gegenüber dem Wildtypen keine veränderte pektolytische Aktivität (Abb. 24). Wie zu sehen ist, konnte sowohl für den Wildtypen als auch die Mutante ein Lysehof –Durchmesser von ca. 1,8 cm beobachtet werden.



Abb. 24: Nachweis der pektolytischen Aktivität mittels PEC-Platten. Gezeigt ist ein Plattentest der die pektolytische Aktivität von jeweils 5 µl einer Bakteriensuspension nach Gegenfärbung mit Ruthenium-Rot zeigt. Entsprechende Bakterien sind in der Beschriftung oberhalb vermerkt. Angegeben ist der Durchmesser des Lysehofes in cm.

Hieraus ergibt sich für den Wildtypen und die Mutante ein Aktivitätsraum der zwischen 3,1 und 3,5 cm³ liegt und somit als nahezu identisch angesehen werden kann. Damit unterscheiden sich Mutante und Wildtyp zumindest auf PEC-Platten nicht signifikant in ihrer pektolytischen Aktivität.

Um das ermittelte Ergebnis in der *in-vivo* Situation zu untersuchen, wurden mit den beschriebenen Bakterienstämmen Knollenscheibchenexperimente durchgeführt.

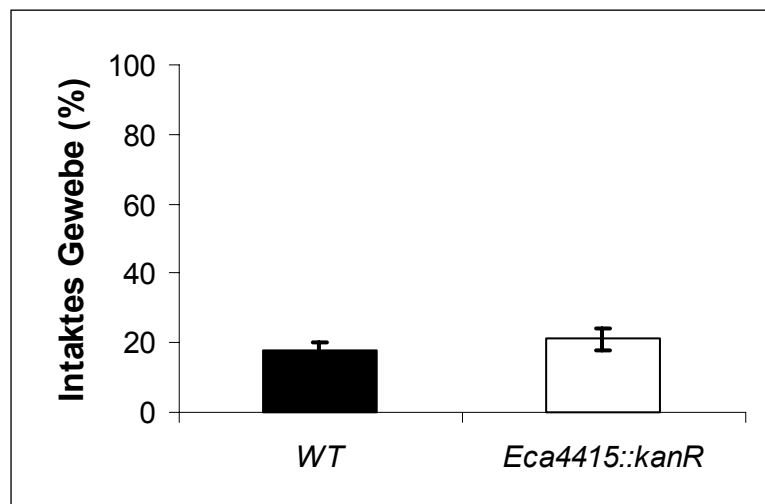


Abb. 25: Quantifizierung des durch Erwinien mazerierten Gewebes mittels Knollenscheibchentests. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt.

Auch hier konnte kein Unterschied zwischen der *Eca4415* Insertionsmutante und dem Wildtypen festgestellt werden. In Knollenscheibchenexperimenten blieben nach Mazeration durch Wildtyp-Zellen 18 ± 2,3 Prozent intaktes Gewebe zurück, bei Knollen welche mit *Eca4415::KanR* Zellen inokuliert wurden 21 ± 3,2 Prozent (Abb. 25). Somit wurde sowohl auf

PEC-Platten als auch in Knollenscheibchenversuchen kein Unterschied in der Mazeration und dementsprechend der Virulenz zwischen dem *Erwinia* Wildtypen und der *Eca4415*-Insertionsmutante festgestellt.

3.3 Untersuchungen zur Karbonsäure-Aufnahme, Verwertung sowie deren Bedeutung für die Virulenz von *Eca* „K.O.“-Mutanten.

Die Pathogenese von *Eca* geht einher mit dem Abbau der pflanzlichen Zellwand und führt wie beschrieben zur Freisetzung verschiedenster Metabolite. Diese können wiederum von *Erwinia* durch Aufnahmesysteme, Transportproteine die sich in der Cytoplasmamembran befinden, aufgenommen werden. Neben Verbindungen die als Quelle für die essentiellen Nährstoffen wie z.B. Schwefel oder Stickstoff dienen, ist vor allem die Kohlenstoffversorgung von zentraler Bedeutung. Neben phosphorylierten Zuckern und diversen Kohlenhydraten, stellen auch Karbonsäuren einen relativ großen Anteil an verfügbaren kohlenstoffhaltigen Metaboliten von pflanzlichen Zellen dar. Diese sind im Falle von heterotrophem Gewebe sofort als direkte C-Quelle verfügbar. Die in großen Mengen vorhandene Speicherstärke bedarf zur weiteren Verwendung als Energiequelle dagegen eines enzymatischen Abbaus der dann, aufnehmbare und verstoffwechselbare Kohlenstoff-Einheiten generiert.

Des weiteren zeigten unabhängige Analysen (Okinaka *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005), dass bei Befall von Chrysanthemen durch *Erwinia chrysanthemi* aber auch bei der Pathogenese von *Erwinia amylovora* auf Birnengewebe, Sequenzen die für Karbonsäure-Aufnahmesysteme und eng verwandte Natrium gekoppelte Dikarbonsäure und Sulfat Transporter kodieren, in ihrer Expression spezifisch induziert werden.

Bei der Suche nach verwandten Sequenzen im *Eca* Genom wurden mehrere Bereiche die für putative Homologe solcher Transporter kodieren, nachgewiesen.

Diese Tatsachen sprachen dafür, die Bedeutung dieser Genprodukte hinsichtlich der Aufnahme von Karbonsäuren zu untersuchen. Weiterhin waren wiederum die Auswirkungen auf den bakteriellen Stoffwechsel und die damit verbundene Pathogenese von besonderem Interesse. Hierzu wurde die Untersuchung der Virulenz bei Verlust der entsprechenden Genprodukte anhand von „K.O.“-Mutanten im Vergleich zum Wildtypen beobachtet. Aus den geschilderten Gründen sollen daher in den nun folgenden Abschnitten die hergestellten Karbonsäuretransporter „K.O.“-Mutanten charakterisiert und hinsichtlich ihrer Virulenz untersucht werden.

3.3.1 ECA3984; Karboxylat-Transporter oder Natrium gekoppelter Sulfat-Transporter?

3.3.1.1 Molekulare Charakterisierung

Als erste Sequenz einer Insertionsmutagenese diente der *Eca3984* Genlokus. Dieser stellte mit seiner überaus großen Homologie gegenüber dem in Okinaka *et al.*, 2002 identifizierten und induzierten Karbonsäuretransporter ein interessantes Ziel dar. Die Einordnung dieser Sequenz als Karbonsäuretransporter kodierend ist allerdings nicht eindeutig, da eine enge Verwandtschaft mit Natrium gekoppelten Sulfat-Transportern durchaus auch eine solche Funktion bedingen kann. Da die Herstellung einer „K.O.“-Mutante die Voraussetzung zur Aufklärung von Funktion und Bedeutung dieser Sequenz für *Erwinia* darstellt, wurde anfänglich ein „K.O.“-Konstrukt hergestellt (pCU33.1). Auch hierbei war die Ermittlung von Abfolge und Orientierung der entsprechenden DNA-Bereiche ausgehend von verschiedenen Primerpaaren und PCR-Analysen unabdingbar (Abb. 26). So konnte mittels einer Gen-spezifischen Primerkombination (Cits/Citas) die Insertion der Kanamycin-Resistenz Kassette und die Unterbrechung des Genes klar nachgewiesen werden (Abb. 26). Hierbei konnte ein Fragment von ungefähr 2567 Basenpaaren amplifiziert werden (Vergleiche Abb. 27). Der Resistenzmarker selbst konnte nochmals mittels den Resistenz-spezifischen Primern (Ks/Kas) nachgewiesen werden.

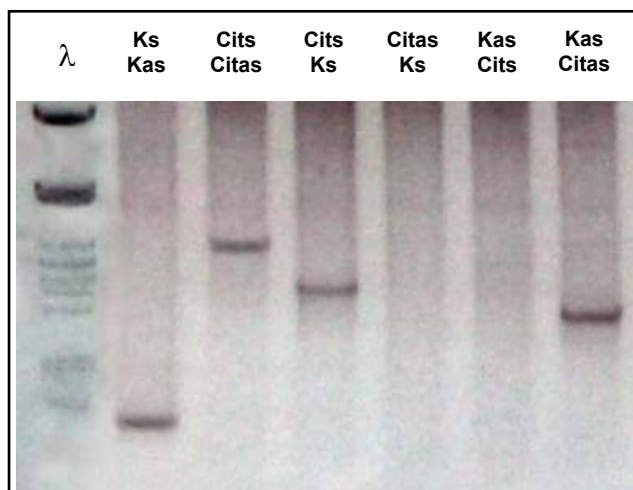


Abb. 26: PCR-Analyse des *Eca3984* (*Cit1*) „K.O.“-Konstruktes. Gezeigt ist ein Agarosegel auf dem PCR-Reaktionsansätze aufgetragen und aufgetrennt wurden. Die verschiedenen Ansätze beinhalten jeweils unterschiedliche Primer-Paare. Die Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10 µM eingesetzt. Als Template wurde das als pCu33.1 bezeichnete Plasmid benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot).

Wie zuvor mussten die zwei möglichen Orientierungen, die bei Insertion des Resistenzmarkers vorliegen können mittels den vier möglichen Primerpaarungen, die sich aus jeweils einem Gen-spezifischen und einem Resistenz-spezifischen Primer ergeben, auf die zutreffende beschränkt werden. Hierbei konnte jeweils bei zwei dieser Paarungen ein charakteristisches PCR-Produkt nachgewiesen werden, wohingegen die verbleibenden zwei kein Produkt lieferten. Abb. 26 zeigt, dass sowohl bei der Primerkombination Cits/Ks als

auch Citas/Kas ein Produkt identifiziert werden konnte. Die amplifizierten Fragmente entsprachen mit 1972 und 1488 Basenpaaren ebenfalls den erwarteten Größen. Wie erwartet lieferten die verbleibenden Primerkombinationen Cits/Kas und Citas/Ks kein Produkt. Hieraus konnte das in Abb. 27 gezeigte entsprechende Orientierungsschema abgeleitet werden. Als Kontrolle wurden die bei der PCR erzeugten Amplifikate mittels Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

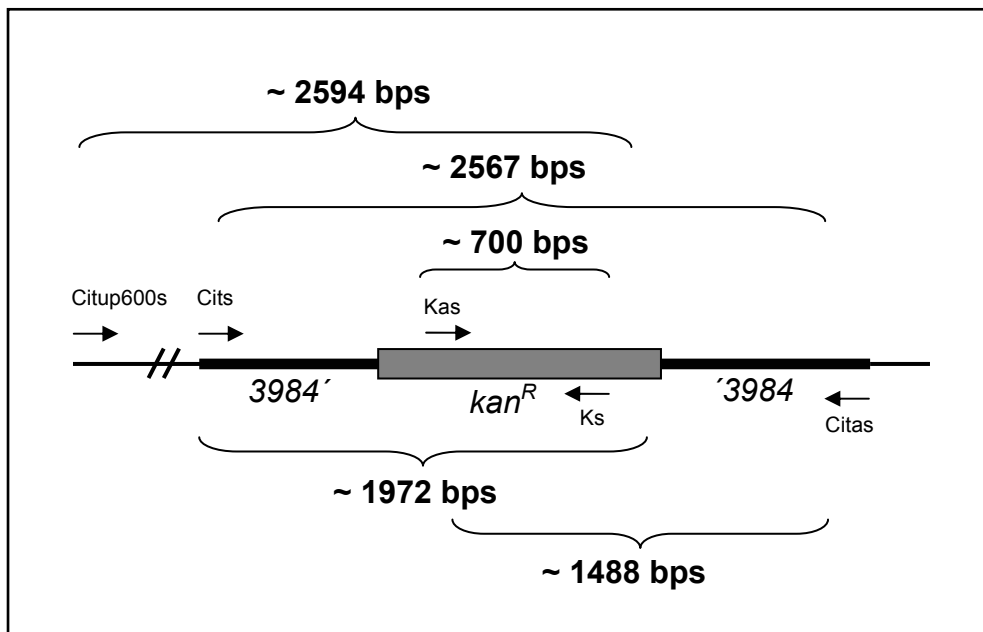


Abb. 27: Orientierungsschema der „K.O.“-Kassette. Gezeigt sind die Orientierungen des *Eca3984* Lokus (*cit1*) und der Kanamycin-Resistenz Kassette (*kan^R*). Die Bezeichnung der jeweiligen Primer ist oberhalb ihrer durch Pfeile markierten Bindestellen angegeben. Die zu erwartenden PCR-Produkte bei entsprechenden Primer-Paarungen sind durch Klammern gekennzeichnet. Die Länge korrespondierender DNA-Fragmente ist oberhalb der Klammern vermerkt.

Nach der Transformation von kompetenten *Eca* Zellen mit dem pCU33.1 Vektor konnten neun putative „K.O.“-Mutanten isoliert werden. Acht dieser neun putativen Mutanten wurden nach Antibiotika-Selektion als Insertionsmutanten die aus einem „double crossing-over“ hervorgingen verifiziert (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend zeigten Sie ein Wachstum auf Kanamycin jedoch nicht auf Ampicillin. Diese verifizierten *Eca3984* Insertionsmutanten wurden zwecks Bestätigung weiteren PCR-Analysen unterzogen. Anhand des Orientierungsschemas (Abb. 27) wurde ein charakteristisches Produkt-Muster als Referenz festgelegt. Wiederum zeigten die acht isolierten Mutanten hierbei ein erwartetes einheitliches Muster (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Analysen wird daher nur eine dieser Mutanten beschrieben.

Wie Abb. 28 zeigt, bestätigten PCR-Analysen das „Ausknocken“ des *Eca3984* Lokus. Dementsprechend zeigte eine Gen-spezifische Primerkombination (Cits/Citas) die um die Resistenz-Kassette verlängerte kodierende *Eca3984*-Sequenz. Die gleiche

Primerkombination führte beim *Erwinia* Wildtypen zur Amplifikation der intakten *Eca3984* Gen-Sequenz. Auch, die Kanamycin-Resistenz konnte mittels den Resistenz-spezifische Primern bei der Mutante amplifiziert werden. Eine Reaktion mit Wildtyp-Zellen führte dagegen zu keinem Produkt. Die beiden charakteristischen Gen/Resistenz spezifischen Primerkombinationen lieferten beim Wildtypen keine Produkte, brachten dagegen bei der Mutante die erwarteten PCR-Produkte hervor.

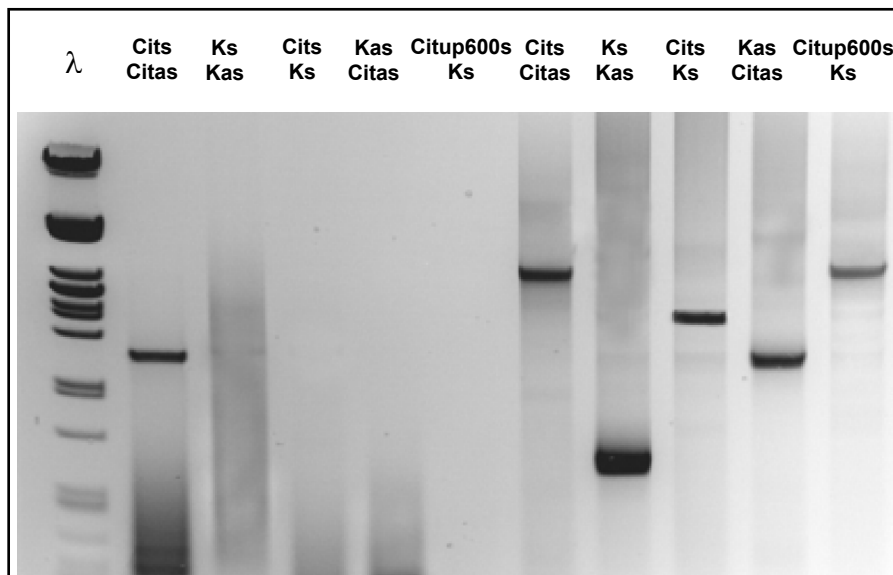


Abb. 28: PCR-Analyse zur Überprüfung der *Eca3984::kan^R* „K.O.“-Mutante und Bestätigung der Lokus-Insertion. Gezeigt ist ein Agarosegel mit entsprechenden Reaktionsansätzen. Die benutzten Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurden *Eca*-Wildtyp als auch *Eca3984::kan^R* Zellen benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot).

Um die, bei den bereits zuvor beschriebenen Mutanten durchgeführte Überprüfung der Rekombination hinsichtlich des *Eca3984* Genlokus anzugehen, wurde wiederum auf eine PCR-Reaktion zurückgegriffen. In diesem Falle wurde diese Reaktion mit einem etwa 600 Basenpaare „upstream“ des Start-ATG gelegenen Primers und dem passenden Resistenz-spezifischen Primer durchgeführt. Mittels dieser Kombination konnte das zuvor bei der Kombination Cits/Ks entstandene Produkt als um 600 Basenpaare verlängert nachgewiesen werden. Dieses bestätigt die Unterbrechung der *Eca3984* Sequenz als Konsequenz einer homologen Rekombination zwischen „suicide vector“ und genomischer Kopie (Vergleiche Abb. 27). Abschließend kann also festgestellt werden, dass die *Eca3984* Sequenz erfolgreich unterbrochen wurde und eine für diese Gensequenz spezifische „K.O.“-Mutagenese hergestellt wurde.

3.3.1.2 Biochemische Charakterisierung

Moderne Sequenzanalysen sind zu einem weit verbreiteten Instrument zur Einordnung und Funktionsbestimmung unbekannter Proteine geworden. Mittels mathematischer Beschreibungen von charakteristischen Motiven, sowie Datenbankabgleichen ist es möglich geworden eine grobe Einteilung von Proteinen allein aufgrund ihrer Aminosäuresequenz vorzunehmen. Solche bioinformatischen Hilfsmittel erlauben wie schon gesagt die Einordnung unbekannter Proteine in Klassen bereits charakterisierter. Jedoch kann aufgrund verschiedener stochastisch nicht erfassbarer Faktoren eine solche Einteilung schwer oder zumindest unzulänglich sein. Besonders bei Proteinen deren Einordnung in Klassen erfolgt, die mehrere relativ eng verwandte Nebenklassen aufweisen, ist eine solche Zuordnung schwierig. Membranproteine die aufgrund ihrer Topologie eine beträchtliche Homologie untereinander aufweisen bedürfen hierbei besonders ausführlicher Analysen. Dennoch ist eine Sequenzanalyse der Aminosäureabfolgen von untersuchten Genprodukten meist recht hilfreich bei der Aufklärung und Suche nach der Funktion des Proteins. Die durch Vergleiche vorgeschlagene putative Funktion verlangt jedoch eine in Folge stattfindende gründliche biochemische Untersuchung.

3.3.1.2.1 Sequenzanalyse

Bei dem in Abb. 29 gezeigten „Alignment“ wurden verschiedene Proteine mit ähnlichen Aminosäureabfolgen untereinander verglichen. Hierbei wurden mit Hilfe von weiteren „in-silico“ Analysemethoden die Lokalisierung putativer Transmembran Helices festgestellt. Neben der ECA3984 Aminosäuresequenz konnten zwei weitere Proteine mit signifikanter Homologie in *Eca* nachgewiesen werden. Weitere Proteine des Alignments sind zum Beispiel der anaerobe Citrat Carrier aus *E.coli*, der 2-oxoglutarat/Glutamat Gegentauscher aus Spinat, ein putativer Kationentransporter aus *Salmonella choleraesius* und ein 2-oxoglutarat/Malat Transporter aus *Staphylococcus aureus*. Durch dieses Alignment geht also klar hervor, dass obwohl als putativer Natrium gekoppelter Sulfattransporter eingestuft und angegeben, ECA3984 eine signifikante Ähnlichkeit zu Karbonsäuretransportern aufweist. Weiterhin wäre eine solche Funktion nicht nur für das ECA3984 Protein, sondern auch für die beiden Homologe ECA4400 und ECA2843 denkbar. Neben Dikarbonsäuretransportern beinhaltet das „Alignment“ auch einen Tricarbonsäuretransporter und selbst einen Kationentransporter. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Funktion des hier untersuchten Proteins entweder um einen sekundär aktiven Sulfat- oder Dikarbonsäuretransport, oder aber auch um einen Karbonsäure-Antiporter (Di- und/oder Tri-Karbonsäuren) handelt. Generell kann

also zwischen einer an Sulfat- oder an Karbonsäure-Transport gekoppelten Funktion unterschieden werden. Durch weitere Experimente zum Transport von den vorangegangenen Substraten kann also möglicherweise, durch Feststellung eines Unterschiedes zwischen *Eca* Wildtyp und Mutante, die putative Funktion des ECA3984 Proteins aufgeklärt werden.

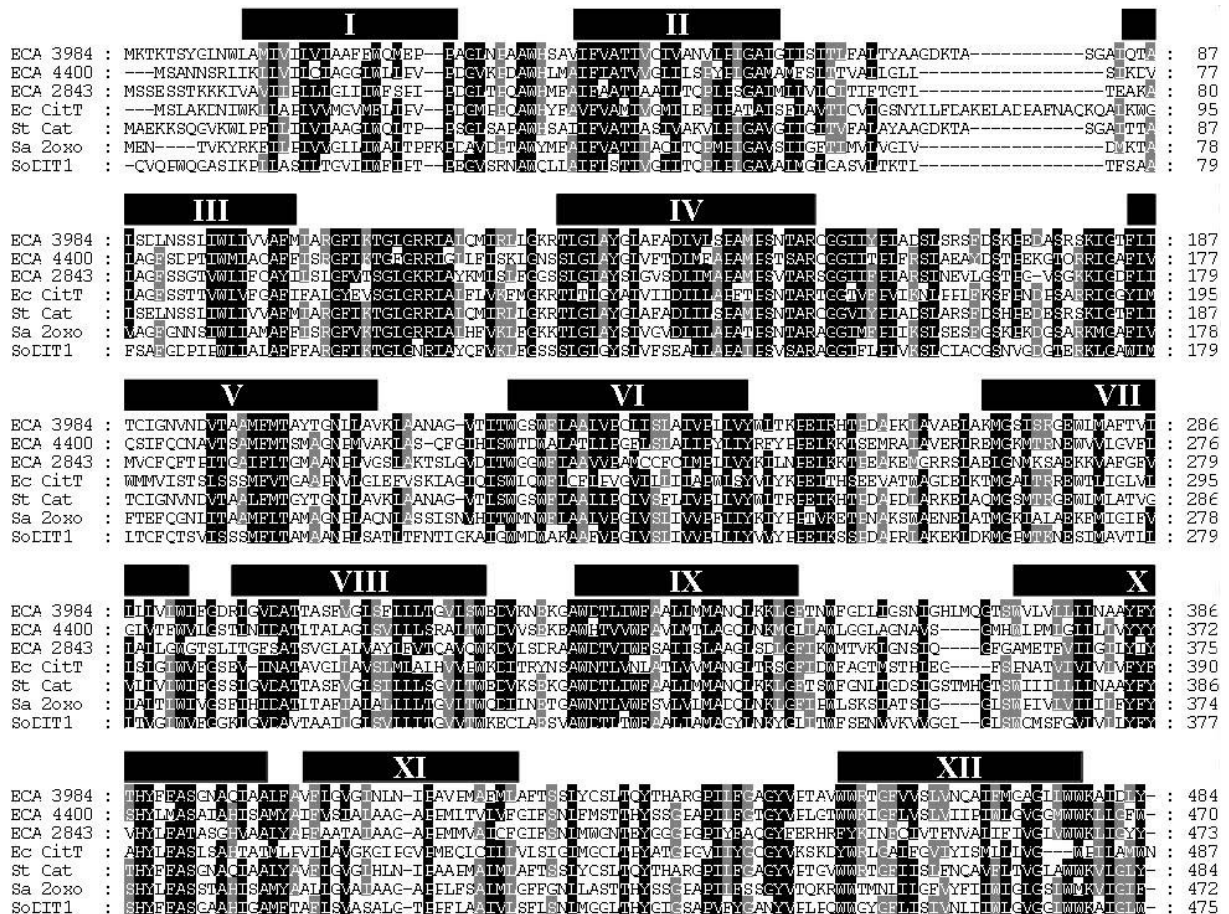


Abb. 29: Aignment des Eca3984 Proteins mit verschiedener Homolgen. Ähnliche oder identische Aminosäurereste unter mindestens sechs der acht gezeigten Proteine sind schwarz hervorgehoben. Konservierte Reste unter fünf Homologen sind grau hinterlegt. Regionen mit putativen Transmembranhelices sind durch schwarze Balken markiert (TMpred, EMBnet.org). Um das gezeigte Alignment zu verbessern wurde das Transitpeptid des SoDIT1-Proteines, die ersten hundert Aminosäuren, nicht berücksichtigt. Links sind jeweils entsprechende Aminosäurepositionen als Nummer angegeben. ECA3984, putativer $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ Symporter -*Erwinia carotovora ssp. atroseptica* (Acc#. CAG76881); ECA4400, putativer $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ Symporter -*Erwinia carotovora ssp. atroseptica* (Acc#. CAG77296); ECA2843, putativer $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ Symporter -*Erwinia carotovora ssp. atroseptica* (Acc#. CAG75743); Ec CitT Citrat Carrier -*Escherichia coli* O157:H7 (Acc#. AAG54947); St Cat, putativer Kationen Transporter -*Salmonella chloraesius* (Acc#. AAX67016); Sa 2oxo, 2-oxoglutarat-Malat Translokator -*Staphylococcus aureus* RF122 (Acc#. CAI82259); SoDIT1, 2-oxoglutarat-Malat Translokator -*Spiancia oleracea* (Acc#. AAA68148).

3.3.1.2.2 Citrat-Verwertung

Um einen potentiellen Defekt der *Eca3984* Insertionsmutante hinsichtlich der Citrat-Aufnahme zu überprüfen wurde ein Anzuchtversuch auf einem Citrat-spezifischen Medium durchgeführt. Das hier verwendete Simmons Citrat Medium (SCM) beinhaltet als einzige Kohlenstoffquelle, Tri-Natrium-Citrat. Hierbei kann unterschieden werden, ob Bakterien Citrat-positiv oder Citrat-negativ sind, also ob Citrat als einzige Kohlenstoffquelle benutzt werden kann oder nicht.

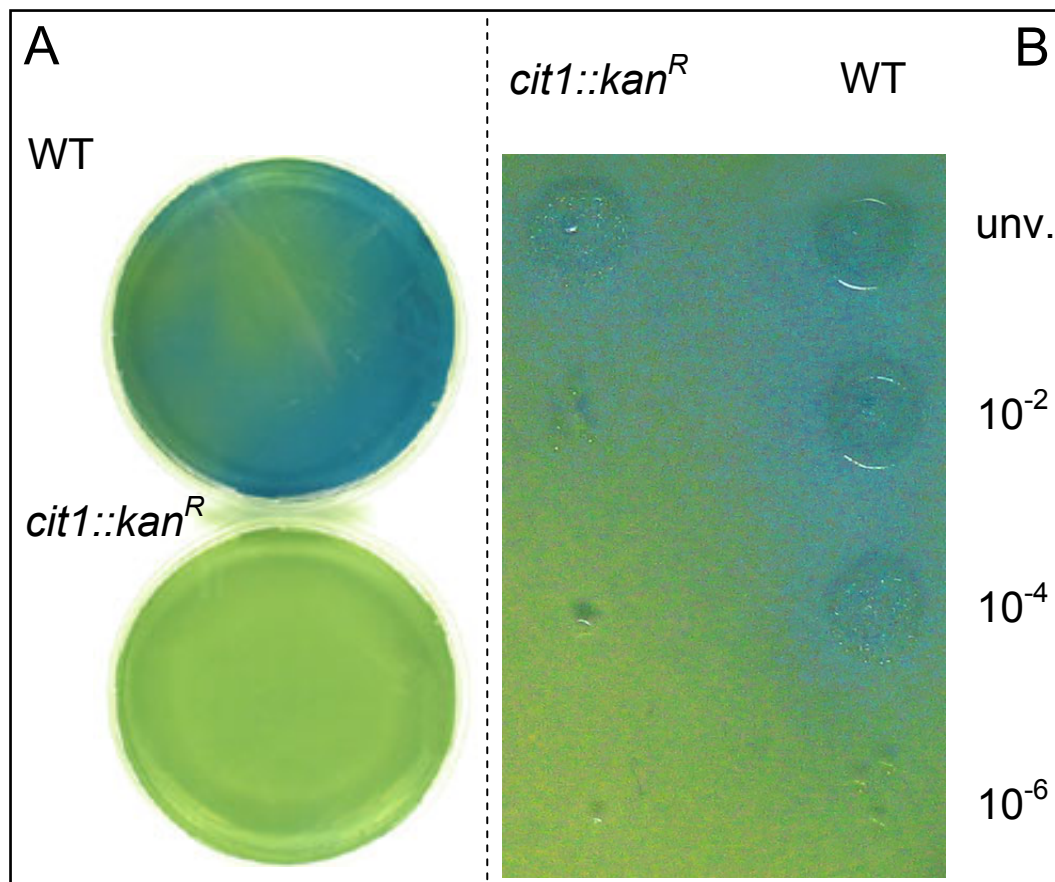


Abb. 30: Wachstumstest auf Simmons Citrat Medium (SCM). A) Ausstrich von *Erwinia* Wildtyp Zellen (WT) und *cit1::kan^R* (*Eca3984::kan^R*) Zellen auf SCM-Platten. Gezeigt ist die visuelle Auswertung nach 48h Inkubation bei 30°C. B) Nahaufnahme eines Wachstumstestes mittels Verdünnungsreihen auf SCM. Nach Anfertigung sukzessiver Verdünnungsreihen für Bakteriensuspensionen einer OD600 = 1 von Wildtyp (WT) und Mutantenzellen (*cit1::kan^R*), wurden jeweils 4µl der rechts angegebenen Verdünnungen auf eine SCM-Agarplatte aufgetropft. Die Auswertung erfolgte visuell nach einer 48 stündigen Inkubation.

Falls eine positive Citratverwertung der Bakterien vorliegt, kann diese durch die Präsenz eines pH-Indikators visualisiert werden. Dabei kann sogar unterschieden werden, ob ein Citrat-Transport mit einer Ansäuerung oder einer Alkalisierung einhergeht. Das normalerweise grün erscheinende Medium, aufgrund der Indikator-Eigenschaften von Bromtoluol-Blau, wechselt im Falle einer Alkalisierung über zu Royal-Blau. Bei einer

Ansäuerung z.B. beim Gegentauch mit einer anderen Karbonsäure erscheint das Medium zitronengelb. Wie in Abb. 30A zu sehen ist, kann beim *Erwinia* Wildtypen eine positive Citratverwertung beobachtet werden. Hierbei ist eine Blaufärbung des SCM-Agars zu beobachten. Interessanterweise zeigten *Eca3984::kan^R* Zellen kein Wachstum auf diesem Medium.

Eine genauere Untersuchung mittels Verdünnungsreihen (Abb. 30 B) bestätigte, dass die *Eca3984* „K.O.“-Mutante einen starken Wachstumsdefizit auf SCM-Medium aufweist. Hierbei waren nur aufgetropfte Zellen einer unverdünnten Bakteriensuspension zum Wachstum befähigt. Bei den jeweiligen Verdünnungen konnten dagegen keine Kolonien beobachtet werden. Im Gegensatz zu der *Eca3984::kan^R* Mutante war der Wildtyp über alle Verdünnungen hinweg zu einem Wachstum auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle in der Lage. Dies äußerte sich durch eine deutliche Blaufärbung des Agars, welche bis zur 10⁻⁴ Verdünnung die entstandenen Bakterienkolonien umgab.

Die hergestellte *Eca3984*-Mutante unterscheidet sich also deutlich in ihrer Citrat-Verwertung vom Wildtypen. Da das funktionelle Genprodukt des *Eca3984* Locus ein Transportprotein ist, kann als mögliche Funktion von einem Citrat-Transporter ausgegangen werden. Aus diesem Grund und um die folgenden Verweise zu erleichtern wird die *Eca3984*-Mutante in Zukunft als *cit1::kan^R* Mutante bezeichnet.

3.3.1.2.3 Wachstumsstudien

Nachweislich zeigt die *cit1* Mutante einen starken Wachstumsdefekt auf Citrat-Medium. Um zu zeigen, dass dieser Defekt spezifisch für Citrat ist und die *cit1* Mutante nicht generell ein retardiertes Wachstum aufweist, wurden Wachstumsanalysen mit Wildtyp und Mutanten Zellen durchgeführt. Hierbei wird das Wachstum einer Bakteriensuspension über die Zeit verfolgt.

Dabei konnte festgestellt werden, dass der bei Citrat auftretende Wachstumsdefekt in Vollmedium nicht mehr zum Tragen kommt. Wie Abb. 31 zeigt konnte über die Zeit kein differentielles Wachstum von der *cit1* Mutante gegenüber dem Wildtypen festgestellt werden. Sowohl in der „Lag“-, als auch in der stationären Phase zeigten beide Stämme vergleichbare Wachstumsraten. Auch der Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase war für beide Linien identisch. Im Minimalmedium mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle zeigte sich jedoch ein anderes Bild. Generell erlangten beide Stämme nicht die OD₆₀₀ Werte von 3 des Vollmediums, dennoch erreichte der Wildtyp eine OD₆₀₀ von ca. 0,8. Bei der *cit1::kan^R* Mutante konnte jedoch keinerlei Wachstum beobachtet werden (Abb. 32). Über die gesamte Messdauer hinweg, verblieb die Mutante bei einer OD₆₀₀ von 0,05 die auch derjenigen bei Beginn des Experimentes entsprach (Abb. 32). Somit konnte nachgewiesen werden, dass

unter Vollmedium ein funktionelles Cit1 Protein für *Eca* nicht unbedingt notwendig ist. Ein solches ist jedoch unter limitierenden Bedingungen, vor Allem wie hier gezeigt, bei Citrat als einziger Kohlenstoffquelle, unentbehrlich.

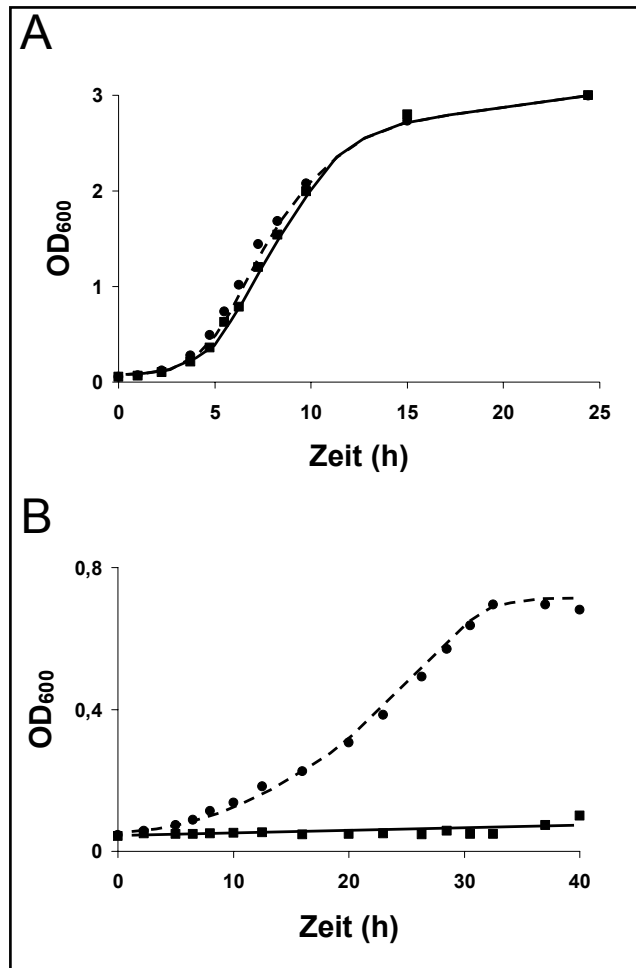


Abb. 31: Wachstumskurve nach Anzucht in LB-Vollmedium. Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf des bakteriellen Wachstums als Zunahme der optischen Dichte (OD₆₀₀). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Regressionskurve wurde mittels eines sigmoidalen Fittings angelegt. Aufgetragen sind der *Erwinia* Wildtyp (●) mit durchgezogener und die *cit1::kan^R* Mutante (■) mit unterbrochener Linie.

Abb. 32: Wachstumskurve nach Anzucht in M9-Minimalmedium (10mM Citrat). Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf des bakteriellen Wachstums als Zunahme der optischen Dichte (OD₆₀₀). Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Regressionskurve wurde mittels eines sigmoidalen Fittings angelegt. Aufgetragen sind der *Erwinia* Wildtyp (●) mit durchgezogener und die *cit1::kan^R* Mutante (■) mit unterbrochener Linie.

3.3.1.2.4 Aufnahmestudien an intakten *Eca*-Zellen

Wie unter Punkt 3.3.1.2.2 und 3.3.1.2.3 gezeigt ist ein funktionelles Cit1 Protein für *Eca* notwendig, um auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Da es sich wie schon Abb. 29 zeigt bei diesem Protein um ein hoch hydrophobes Genprodukt mit zwölf putativen transmembranen Domänen handelt, ist eine Funktion als Transportprotein sehr wahrscheinlich. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden Transportversuche durchgeführt. Da sich bisher eine heterologe Expression im *E.coli* System als wenig erfolgreich gestaltete, wurden die jeweiligen Transportversuche direkt an intakten *Erwinia*-Zellen durchgeführt.

Wie Abb. 33 zeigt konnte bei Experimenten mit radioaktiv markiertem Citrat eine zeitabhängige Aufnahme in *Erwinia* Wildtyp Zellen nachgewiesen werden. Zellen der Insertionsmutante zeigten dagegen keinerlei Aufnahme von radioaktivem Substrat. Bei einer Konzentration von 12μM Citrat im Aufnahmemedium folgte die beobachtete

Aufnahmecharakteristik für den *Erwinia* Wildtypen einem komplexen Kurvenverlauf. Hierbei stieg während der ersten zehn Sekunden die Aufnahmerate an um sich dann nach 30 Sekunden einem Wert von ca. $80 \text{ pmole} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ anzunähern (Abb. 33). Ab einer Minute erfolgte dann eine starke Erhöhung der Citrat-Aufnahme, die nach etwa fünf Minuten bei einer Rate von ungefähr $700 \text{ pmole} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ die stationäre Phase erreichte (Abb. 33).

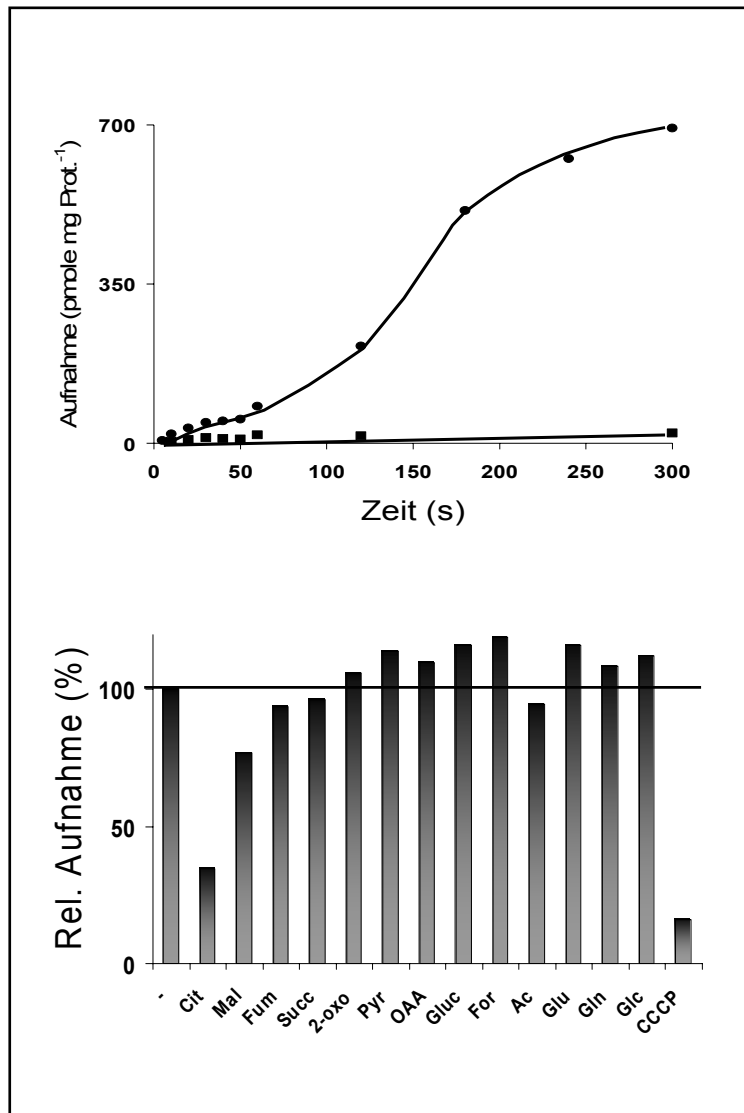


Abb. 33: Zeitabhängigkeit der $[1,5-^{14}\text{C}]$ Citrat-Aufnahme an intakten Erwinien-Zellen. Die benutzten Zellen wurden in Vollmedium bei 30°C angezogen. Transportversuche wurden mit Wildtyp (●) und Mutanten (■) Zellen bei einer Citrat-Konzentration von $15\mu\text{M}$ und einer Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt. Die gezeigten Werte entsprechen jeweils Mittelwerten aus Triplikaten dreier unabhängiger Versuche.

Abb. 34: Effektorversuche an intakten Erwinien-Zellen. Die benutzten Zellen wurden in Vollmedium bei 30°C angezogen. Transportversuche wurden mit Wildtyp Zellen bei einer Citrat-Konzentration von $15\mu\text{M}$ und einer Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt. Effektoren wurden im zehnfachen Überschuss ($150\mu\text{M}$) angeboten. Als Bezugswert wurde ein Ansatz ohne Effektor benutzt dessen Aufnahme als 100% definiert wird. Die gezeigten Werte entsprechen jeweils Mittelwerten aus Triplikaten dreier unabhängiger Versuche.

Um den gemessenen Citrat-Transport näher zu charakterisieren wurde weiterhin mittels Effektorversuchen das Substratspektrum des Cit1-Proteins ermittelt. Hierbei wurde versucht mittels eines im zehnfachen Überschuss zugegebenen, nicht radioaktiv markierten putativen Substrates das radioaktive Substrat Citrat zu verdrängen. Bei einem signifikanten Abfall der Citrat-Aufnahme kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der im Überschuss eingesetzten Substanz um ein transportiertes Substrat des untersuchten Proteins handelt. So konnte gezeigt werden, dass Malat als einzige weitere Karbonsäure die Citrat-Aufnahme durch das Cit1 Protein beeinflusst. Hierbei war ein Rückgang auf bis zu

80% der Aufnahme ohne Effektor zu beobachten (Abb. 34). Fumarat, Succinat und Acetat zeigten nur einen sehr schwachen Effekt und beeinflussten die Citrat-Aufnahme kaum. Alle weiteren getesteten Karbonsäuren zeigten keinen oder einen schwach induzierenden Effekt. Wurde Citrat selbst als Effektor im zehnfachen Überschuss angeboten war ein Abfall der Aufnahme um 60% zu beobachten (Abb. 34). Hiermit erscheint das Cit1 Protein als ein hochspezifischer Citrat-Transporter.

Neben organischen Säuren wurde auch der Einfluss von Cyanid *m*-chlorophenylhydrazon (CCCP), einem Protonophor auf die Citrat-Aufnahme getestet. Dabei wurde festgestellt, dass bei einer Konzentration von 50 μ M CCCP die Citrat-Aufnahme durch Cit1 nahezu zum Erliegen kommt (Abb. 34). Dies deutet darauf hin dass der Transport von Citrat über den Cit1-Transporter protonengekoppelt ist und über die bakterielle *pmf* energetisiert wird.

Um den weiter oben festgestellten Malat-Einfluss auf die Citrat-Aufnahme näher zu charakterisieren, wurden weitere Transportexperimente mit Wildtyp Erwinien Zellen durchgeführt.

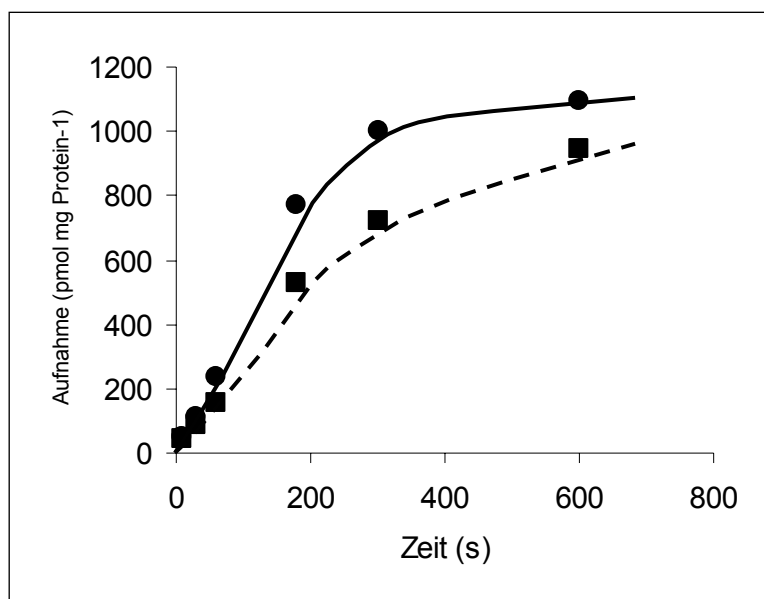


Abb. 35: Zeitabhängigkeit der [1,5-¹⁴C] Citrat-Aufnahme unter Malat-Beeinflussung von Erwinien-Zellen. Die benutzten Zellen wurden in Vollmedium bei 30°C angezogen. Transportversuche wurden mit Wildtyp Zellen ohne Zugabe (●) und mit Zugabe (■) von 120 μ M Malat bei einer Citrat-Konzentration von 15 μ M und einer Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt. Die gezeigten Werte entsprechen jeweils Mittelwerten aus Triplikaten dreier unabhängiger Versuche.

Da mittels Effektorversuche eine Beeinflussung der Citrat-Aufnahme durch Malat festgestellt wurde (Abb. 34), sollte dies genauer untersucht werden. Hierzu wurde eine Zeitkinetik der Citrat-Aufnahme bei gleichzeitiger Anwesenheit von im Überschuss gegebenen Malat ermittelt. Wie Abb. 35 zeigt, bleibt der Einfluss von Malat über die ganze Versuchsdauer bei den weiter oben schon beobachteten 20%. Allerdings zeigt sich bei sehr kurzen Inkubationszeiten nur eine geringe Abnahme der Citrat Transportrate durch das zugesetzte Malat.

Deshalb ist Malat kein bevorzugtes Substrat des Cit1 Proteins, dessen Aufnahmeraten sich für das Hauptsubstrat Citrat selbst durch einen zehnfachen Überschuss an Malat nicht signifikant verringern lassen.

Neben dem Protonen gekoppelten Transport von Citrat ist durch die Literatur bekannt, dass eine Citrat-Aufnahme durch weitere unterschiedliche Transporter und Mechanismen vermittelt und beeinflusst wird (Li & Pajor, 2002; Kästner et al., 2003; Hall & Pajor, 2005). Besonders ein Symport von Citrat mit Kationen wie Natrium aber auch als $\text{Mg}^{2+}/\text{HCitrat}^{2-}$ Komplex sind weit verbreitet.

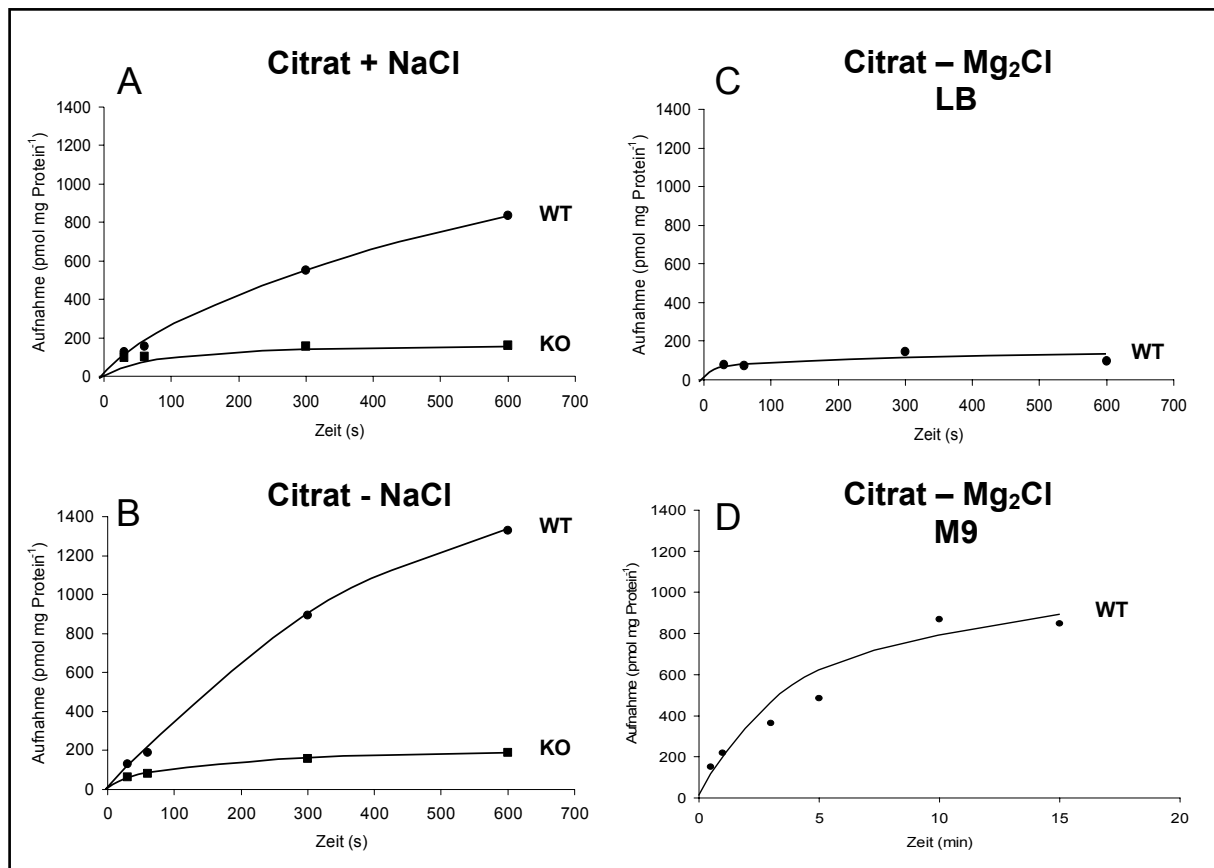


Abb. 36: Zeitabhängige Citrat-Aufnahme unter verschiedenen Anzucht- und Transportbedingungen. Die benutzten Zellen wurden bei 30°C angezogen. Transportversuche wurden mit Wildtyp (●) und Mutanten (■) Zellen bei einer Citrat-Konzentration von 15μM und einer Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerten aus Triplikaten zweier unabhängiger Versuche. (A) Aufnahme von Citrat 15μM in Anwesenheit von 1mM NaCl nach Anzucht der Zellen in LB-Vollmedium. (B) Aufnahme von Citrat 15μM ohne NaCl nach Anzucht der Zellen in LB-Vollmedium. (C) Aufnahme von Citrat in Gegenwart von 10mM MgCl₂ nach Anzucht der Zellen in LB-Vollmedium. (D) Aufnahme von Citrat in Gegenwart von 10mM MgCl₂ nach Anzucht der Zellen in M9-Minimalmedium supplementiert mit 10mM Citrat. Eingesetzt wurden Zellen gleicher OD.

Deshalb wurde neben den bisherigen Transportversuchen, die eine Aufnahme von Citrat als freie Säure voraussetzten auch die Aufnahme bei Präsenz von Natrium-Ionen getestet. Hierbei wurde festgestellt, dass bei einer Konzentration von 1mM NaCl nach 10

Minuten eine Aufnahme von ungefähr $900 \text{ pmole} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ erreicht wurde (Abb. 36 A). Diese lag demnach leicht unter der Aufnahme die bei Transportversuchen ohne Zugabe von NaCl nur mit Citrat als freier Säure erreicht wurde (Abb. 36 B). In beiden Fällen konnte für die *cit1::kan^R* Mutante nahezu keine Aufnahme festgestellt wurde. Eine geringer Hintergrundaktivität von ungefähr $100 \text{ pmole} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ konnte jedoch beobachtet werden (Abb. 36 A, B).

Neben diesen Transportmodi für Citrat ist auch eine Aufnahme als $\text{Mg}^{2+}/\text{HCitrat}^{2-}$ Komplex bekannt. Diese wird durch ein bei zahlreichen Bakterien bereits charakterisiertes System CitM vermittelt. Das *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* Genom weist eine DNA-Sequenz auf die ähnlich zu den erwähnten kodierenden Sequenzen von CitM-Homologen, ist. Dementsprechend war es äußerst interessant zu überprüfen, ob unter den angewendeten Bedingungen auch eine Aufnahme von Citrat als Mg^{2+} Komplex zu beobachten ist. Wie Abb. 36 C zeigt konnte kein Transport von $\text{Mg}^{2+}/\text{HCitrat}^{2-}$ nach Anzucht von *Eca* Wildtyp Zellen in LB Vollmedium festgestellt werden. Unter solchen Bedingungen zeigten *Erwinia* Wildtyp-Zellen gegenüber Versuchen mit Citrat als freier Säure eine nur sehr geringe Hintergrundaufnahme. Diese lag sogar unter der gemessenen Aufnahmerate für die *Eca cit1::kan^R* Mutante.

Wurden die Zellen dagegen vor Transportversuchen, hinsichtlich der Aufnahme von $\text{Mg}^{2+}/\text{HCitrat}^{2-}$, in Citrat-Minimalmedium angezogen, konnte eine zeitabhängige Aufnahme festgestellt werden (Abb. 36 D). Diese folgte einer Kurve, die jedoch deutlich später als bisherige Aufnahmen mit Citrat als freier Säure im Symport mit Protonen oder Kationen in die Sättigung eintrat. Des Weiteren lagen die gemessenen Aufnahmeraten mit $500 \text{ pmole} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ leicht unter denen der freien Säure (Abb. 36 B, D).

3.3.1.2.5 Komplementation der *Eca cit1::kan^R* Mutante

Bisher konnte gezeigt werden, dass es sich bei Cit1 Protein um einen hoch spezifischen Citrat-Transporter handelt (Abb. 33), der durch die bakterielle *pmf* angetrieben wird (Abb. 34). Weiterhin ist ein funktionelles Cit1 Protein notwendig um *Erwinia* ein Wachstum auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle zu ermöglichen (Abb. 30; Abb. 32). Um eine biochemische Charakterisierung vor Allem auf molekularem Level abzuschließen, sollte eine Komplementation der erzeugten *cit1::kan^R* Insertionsmutante versucht werden.

Hierzu wurde die aus *Eca*, für das Cit1 Protein kodierende DNA-Sequenz unter Kontrolle des nativen Promoters in einen pBSK-Klonierungsvektor eingebracht. Dieses Konstrukt wurde dann wiederum benutzt um *cit1::kan^R* Zellen zu transformieren. Um eine erfolgreiche Komplementation zu überprüfen wurden Anzuchtversuche auf verschiedenen Medien durchgeführt. Wie in Abb. 37 zu sehen ist, kann eine erfolgreiche Transformation der *cit1::kan^R* Mutante mittels verschiedenen Antibiotika überprüft werden. Hierbei kommen die

als Selektionsmarker benutzten Resistenzgene zum Einsatz. Demzufolge ist der *Erwinia* Wildtyp weder zu Wachstum auf Ampicillin noch auf Kanamycin befähigt (Abb 37). Die *cit1::kan^R* Mutante trägt eine genomische Kanamycin-Resistenz durch die Mutagenese des *Eca3984* Genlokus und wächst deshalb auf Kanamycin haltigem Medium. Wird diese Mutante nun durch das Einbringen eines Vektors (welcher eine Ampicillin-Resistenz trägt) komplementiert, so können die resultierenden Zellen sowohl auf Ampicillin als auch auf Kanamycin wachsen (Abb. 37 C, D).

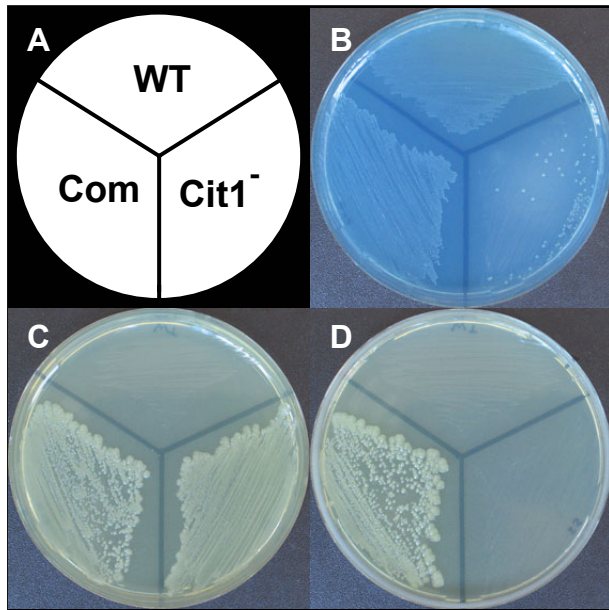


Abb. 37: Komplementation der *cit1::kan^R* Insertionsmutante. Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Bakterien auf verschiedenen Medien. (A) Schablone zur Identifizierung der jeweiligen Stämme (WT = *Erwinia* Wildtyp; Cit1⁻ = *cit1::kan^R* Insertionsmutante; Com = komplementierte Insertionsmutante) (B) Simmons Citrat Medium, Na-Citrate 0,2% als einzige Kohlenstoffquelle. (C) LB-Vollmedium mit Kanamycin (50µg/ml) (D) LB-Vollmedium mit Ampicillin (200µg/ml)

Die eigentliche Überprüfung einer Komplementation beinhaltet, ob das Einbringen einer intakten *cit1* Kopie unter dem nativen Promoter die *cit1::kan^R* Mutante wieder zum Wachstum auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle befähigt. Abb. 37 B zeigt, dass außer dem *Erwinia* Wildtypen nur die komplementierten *cit1::kan^R* Zellen auf SCM-Medium wachsen können. Damit konnte gezeigt werden, dass der Wachstumsdefekt in Citrat-Minimalmedium aufgrund eines nicht funktionellen Cit1 Proteins, allein durch das Einbringen einer funktionellen Kopie unter der Kontrolle des nativen Promotors wieder aufgehoben werden kann. Auch mittels weiteren PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass das eingebrachte Konstrukt verantwortlich und ausreichend für eine Wiederherstellung der Citratverwertung der *cit1::kan^R* Mutante ist (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.3 Phytopathologische Charakterisierung

Neben der bisherigen biochemischen Untersuchung der Eigenschaften des Cit1 Proteins ist eine phytopathologische Charakterisierung nicht nur überaus interessant

sondern erlaubt vor Allem weitere Aussagen über die Einbindung des Cit1 Proteins in die Pathogenese von *Eca* zu tätigen. Eine erste Einschätzung der pektolytischen Aktivität ermöglichen die bereits öfters genutzten PEC-Platten Versuche. So zeigte die *cit1::kan^R* Insertionsmutante auf PEC-Platten gegenüber dem Wildtypen eine signifikant reduzierte pektolytische Aktivität (Abb. 38). Wie zu sehen ist, konnte für die Insertionsmutante ein Lysehof-Durchmesser von ca. 1,5 cm beobachtet werden. Der *Erwinia* Wildtyp wies dagegen einen mit ungefähr 2 cm deutlich größeren Lysehof auf, was auf eine entsprechend höhere pektolytische Aktivität Rückschließen lässt.

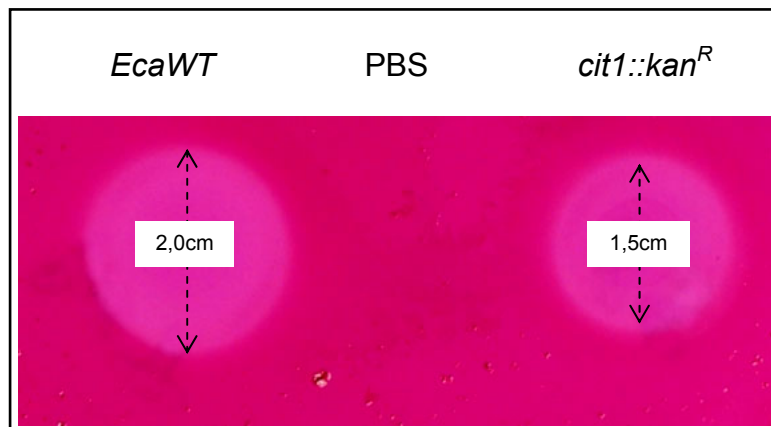


Abb. 38: Nachweis der pektolytischen Aktivität mittels PEC-Platten. Gezeigt ist ein Plattentest der die pektolytische Aktivität von jeweils 5µl einer Bakteriensuspension nach Gegenfärbung mit Ruthenium-Rot zeigt. Entsprechende Bakterien sind in der Beschriftung oberhalb vermerkt. Angegeben ist der Durchmesser des Lysehofes in cm.

Hieraus ergibt sich für den Wildtypen ein Aktivitätsraum der mit 4,18 cm³ deutlich größer ist als für die *cit1::kan^R* Mutante. Dieser beträgt nur 1,77 cm³ und deutet damit auch auf eine signifikante Reduzierung der Virulenz der *Eca cit1::kan^R* Mutante hin.

Um das ermittelte Ergebnis in der *in-vivo* Situation zu untersuchen, wurden mit Wildtyp, *cit1::kan^R* und komplementierten Zellen der Insertionsmutante Knollenscheibchen-Experimente durchgeführt.

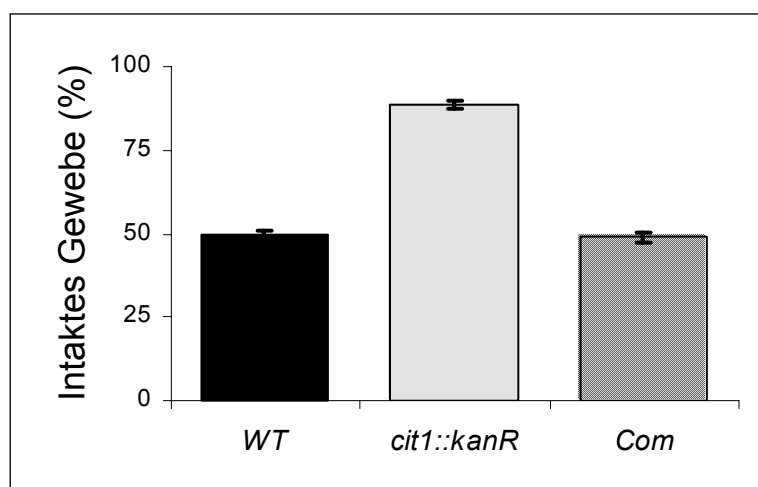


Abb. 39: Quantifizierung des durch Erwinien mazerierten Gewebes mittels Knollenscheibchentests. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt.

Auch hier zeigte die *cit1::kan^R* Mutante einen signifikant schwächeren Befall. Dementsprechend konnte nur 12% intaktes Gewebe mazeriert werden (Abb. 39). Der Wildtyp mazerierte in den gleichen Versuchen nahezu die Hälfte des Knollengewebes. Auch die komplementierte *cit1::kan^R* Mutante wies identische Mazerierungsraten als der Wildtyp auf. Demnach zeigten sowohl PEC-Platten als auch Knollenscheibchenversuchen, dass ein funktionierendes Cit1 Protein für eine maximale Pathogenese unter den gewählten Bedingungen notwendig ist. Eine Reduktion der Virulenz, bedingt durch ein nicht funktionelles *cit1* Genprodukt kann des Weiteren durch erneutes Einbringen einer intakten *Eca3984* Gensequenz auf Wildtyp-Niveau gesteigert werden und resultiert in einer vierfach höheren Kartoffelgewebe Mazeration.

3.3.1.3.1 Auswirkungen einer unterbrochenen *cit1* Sequenz auf das Wachstum von *Eca* auf Kartoffelknollengewebe

Die bisherigen Versuche zeigten, dass das Cit1 Protein notwendig für ein Wachstum auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle und eine volle Entfaltung der Virulenz und demzufolge einer Mazerierung von Kartoffelknollengewebe ist. Der direkte kausale Zusammenhang dieser beider Tatsachen konnte bisher jedoch noch nicht genauer beschrieben werden. Um zu überprüfen ob bei der Insertionsmutante ein Wachstumsdefizit aufgrund einer Citrat Mangelversorgung besteht, wurde versucht die Lebendkeimzahl nach Befall von Kartoffelknollengewebe zu ermitteln.

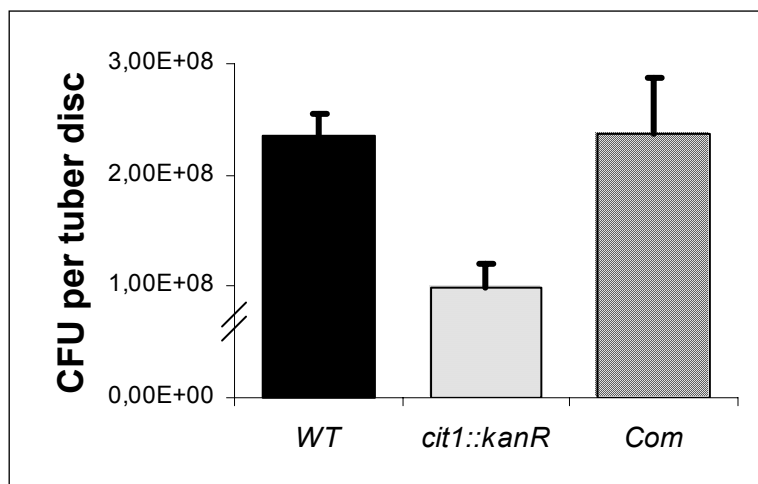


Abb. 40: Bestimmung der Colony-forming units (CFU) . Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt. CFU's sind als Vielfaches von Zehnerpotenzen angegeben (Ordinate). Alle Versuche wurden mit Wildtyp Kartoffelknollen durchgeführt.

Hierbei stellt sich heraus, dass Zellen der *cit1::kan^R* Insertionsmutante tatsächlich eine reduzierte Kolonienzahl nach dem Wachstum auf Kartoffelknollenscheibchen gegenüber dem Wildtypen zeigen. So konnten sowohl für den Wildtypen als auch die

komplementierte „K.O.“-Mutante Lebendkeimzahlen von bis zu $3 \cdot 10^8$ CFU's pro Knollenscheibchen gezählt werden (Abb. 40). Für die *cit1::kan^R* Mutante konnten dagegen nur ungefähr $9 \cdot 10^7$ CFU's pro Knollenscheibchen beobachtet werden (Abb. 40). Zwar wurde somit ein beeinträchtigtes Wachstum der *cit1::kan^R* Mutante festgestellt, dieses alleine reicht jedoch nicht aus um die signifikant schlechtere Pathogenese auf Knollenscheibchen zu erklären. Da neben Wildtyp Kartoffelpflanzen auch NTT-antisense Pflanzen und Knollen zur Verfügung standen, könnten weitere Versuche an diesen vielleicht mehr Aufschluss bringen.

3.3.1.3.2 Metaboliten-Bestimmung an Kartoffelknollengewebe

Wie bereits erwähnt, stellen NTT-antisense Kartoffeln eine interessante Erweiterung zu den bisher immer an Wildtyp-Knollen durchgeführten Scheibchentests dar. Durch ihre veränderte Metaboliten-Zusammensetzung und ihre mittels eines „Priming“-Effektes erhöhte Resistenz gegen eine Vielzahl an Pathogenen sind sie ein sehr gutes Testsystem zur Untersuchung von Wirt-Pathogen Beziehungen. Da schon durch diverse Experimente eine Bedeutung von Citrat bei *in-vivo* als auch *in-vitro* Wachstum für *Erwinia* gezeigt werden konnte, ist eine weitere Determinierung der Bedeutung dieser Metabolite für die Pflanze dementsprechend wichtig.

Tab. 3.1: Bestimmung verschiedener Metabolitgehalte in Knollengewebe von Wildtyp und NTT-antisense Pflanzen. Angegeben sind die ermittelten Werte in der angegebenen Konzentration unter den Metaboliten pro Gramm Frischgewicht. Daten entsprechen jeweils Mittelwerten mit dem dazugehörigen Standardfehler. *Werte wurden von Dr. Geigenberger, MPI Golm ermittelt (Geigenberger *et al.*, 2001).

Pflanzenlinie	Metabolit			
	Citrat (nmol/gFW)	Isocitrat* (nmol/gFW)	Malat* (μmol/gFW)	Glukose* (μmol/gFW)
NTT-antisense	53 ± 1,6	40 ± 2,5	8 ± 0,2	80 ± 1,7
WT	189 ± 5,7	140 ± 3,7	5 ± 0,1	7 ± 1,3

Wie schon in vorangegangenen Analysen gezeigt (Linke 2003; Geigenberger *et al.*, 2001), weisen NTT-antisense Knollen stark erhöhte Werte an freien Zuckern auf. Mit 80 μmol/g Frischgewicht, liegen diese deutlich über jenen Werte die für Wildtyp Knollen ermittelt wurden (Tab. 3.1). Neben den Kohlenhydratgehalten waren aber besonders die Konzentrationen an organischen Säuren durch die neuesten Erkenntnisse hinsichtlich Citrats und dem Cit1 Protein von besonderem Interesse. Hierbei stellte sich heraus, dass Malat mit 8 μmol/g Frischgewicht in NTT-antisense Knollen leicht erhöht gegenüber Wildtyp Knollen

(5 µmol/g Frischgewicht) vorlag. Für Citrat und Isocitrat konnten dagegen stark reduzierte Gehalte bei NTT-antisense Kartoffelknollen im Vergleich zu Wildtyp Knollen gemessen werden. Diese waren um den Faktor drei bis vier reduziert (Tab. 3.1).

Da also unter anderem NTT-antisense Knollen eine erhöhte Resistenz gegenüber *Eca* zeigen und zusätzlich verminderte Citrat-Konzentrationen aufweisen, ist eine Analyse möglicher Zusammenhänge nahe liegend. Demnach müsste eine Veränderung dieser Metabolite mit einer veränderten Virulenz der Erreger einhergehen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Geigenberger (MPI, Golm) und der Hilfe von Thomas Reinhold (AG Neuhaus) verschiedenste Metabolite, sowie ihre zeitliche Veränderung ohne und nach Befall von *Erwinia* in Wildtyp und NTT-antisense Knollenscheibchen bestimmt (Kap. 2.2.13).

Tab. 3.2: Bestimmung der zeitabhängigen Veränderung von Metabolite in Gegenwart und Abwesenheit von *Erwinia* (Kap. 2.3.1) in Knollengewebe von Wildtyp und NTT1-antisense Kartoffelpflanzen. Angegeben sind die ermittelten Werte als Vielfaches der zum Zeitpunkt Null (0h) gemessenen Konzentration. Der zum Zeitpunkt Null gemessene Wert wurde sowohl für Wildtyp als auch NTT-antisense Knollen als 1 definiert. Die ermittelten Werte entsprechen jeweils Mittelwerten. Des Weiteren sind für die aufgelisteten Metabolite die Ergebnisse bei Gegenwart (12h + *Eca*) und Abwesenheit (12h – *Eca*) von *Eca* Wildtyp-Zellen nach zwölfstündiger Inkubation angegeben. (Werte von durch Dr. Geigenberger, MPI Golm ermittelt und mitgeteilt). Experimente wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Zur Metabolitbestimmung wurde jeweils nur das Knollengewebe benutzt.

	WT			NTT-antisense (AS)		
	0h	12h - <i>Eca</i>	12h + <i>Eca</i>	0h	12h - <i>Eca</i>	12h + <i>Eca</i>
Citrat	1	5,63	0,29	1	0,58	0,35
Fumarat	1	0,96	1,68	1	1,19	1,28
Malat	1	0,74	0,32	1	1,12	0,58
Succinat	1	3,35	2,84	1	3,04	3,47

Ergänzend zu der Feststellung, dass NTT-antisense Pflanzen geringere Citrat-Gehalte gegenüber Wildtyppflanzen aufweisen, wurde die Veränderung ausgewählter Karbonsäuren in Gegenwart sowie in Abwesenheit von *Eca* Wildtyp Zellen verfolgt. So konnte ermittelt werden, dass sowohl für Fumarat als auch Malat keine signifikanten Unterschiede nach zwölfstündiger Inkubation von Wildtyp- und NTT-antisense Knollenscheibchen mit *Eca* Zellen nachweisbar sind. Auch bei Abwesenheit von *Erwinia* bewegten sich die Werte zwischen dem 0,3-1,6fachen der zu Beginn des Versuches ermittelten Konzentration der betrachteten Metabolite (Tab. 3.2). Die Succinat-Konzentration stieg gegenüber dem Null-Wert nach zwölfstündiger Inkubation ohne *Eca* Zellen um das dreifache an. Eine signifikante Abnahme in Gegenwart von *Erwinia* Wildtyp-Zellen war jedoch nicht detektierbar. Dieses Phänomen konnte sowohl bei Wildtyp als auch NTT-

antisense Knollenscheibchen beobachtet werden. Die Citrat-Konzentration erfuhr jedoch signifikante Veränderungen unter den betrachteten Bedingungen. Des Weiteren konnte für Citrat ein differentielles Verhalten hinsichtlich Wildtyp und NTT-antisense Knollen festgestellt werden. Wie Tab. 3.2 zu entnehmen ist, steigt die Citrat-Konzentration bei Ausstechen und folgender zwölfstündiger Inkubation ohne Erwinien-Zellen bei Wildtyp Knollenscheibchen um das 5,6fache an. In Gegenwart von Erwinien-Zellen ist nach zwölf Stunden kaum noch Citrat nachweisbar. Da NTT-antisense Knollen per se geringe Citrat-Konzentrationen aufweisen, verwundert es nicht, dass nach zwölfstündiger Inkubation ohne Inokulation kaum Citrat nachgewiesen werden kann. Die Menge an vorhandenem Citrat ändert sich auch nach Inokulation mit Erwinien Zellen kaum (Tab. 3.2). Somit konnte klar gezeigt werden, dass die Citrat-Gehalte von WT Knollen sich je nach Präsenz oder Abwesenheit von Erwinien Zellen ändern. Weiterhin konnte anhand der gemessenen Werte ermittelt werden, dass sich die Citrat-Gehalte bei Wildtyp und NTT-antisense Pflanzen unterschiedlich bei Verletzung (Inkubation ohne *Eca*) oder Befall durch *Erwinia* verhalten. Um dieses unterschiedliche Verhalten besser vergleichen zu können, wurden die relativen Verhältnisse für die untersuchten Bedingungen ermittelt.

Tab. 3.3: Bestimmung der Verhältnisse zeitabhängiger Metabolit-Veränderungen in Gegenwart und Abwesenheit von *Erwinia* in Knollengewebe von Wildtyp und NTT1-antisense Kartoffelpflanzen. Angegeben sind die relativen Verhältnisse der in Tab. 3.2 angegebenen Werte. Des Weiteren sind für die aufgelisteten Metabolite die Ratio bei Gegenwart (12h + *Eca*) und Abwesenheit (12h – *Eca*) von *Eca* Wildtyp-Zellen nach 12 stündiger Inkubation für Wildtyp gegenüber NTT-antisense Pflanzen angegeben. (Werte wurden durch Dr. Geigenberger, MPI Golm ermittelt).

	WT/AS		WT	AS
	12h - <i>Eca</i>	12h + <i>Eca</i>	12h -/12h +	12h -/12h +
Citrat	9,71	0,83	19,41	1,66
Fumarat	0,81	1,31	0,57	0,93
Malat	0,66	0,55	2,31	1,93
Succinat	1,10	0,82	1,18	0,88

Hierbei konnte festgestellt werden, dass für die untersuchten Karbonsäuren außer Citrat die Verhältnisse bei nahezu jeder Vergleichssituation sich um einen Faktor eins bewegen. So konnten keine signifikanten Veränderungen für Fumarat, Malat und Succinat bei Wildtyp und NTT-antisense Knollengewebe zwischen Präsenz und Abwesenheit von *Eca* nach zwölfstündiger Inkubation festgestellt werden (Tab. 3.3).

Citrat dagegen unterlag relativ starken Veränderungen unter diesen Bedingungen. So ist aus Tab. 3.3 zu entnehmen, dass nach einer zwölfstündigen Inkubation Wildtypknollengewebe fast zehnmal mehr Citrat aufweist als NTT-antisense Knollen.

Weiterhin konnte ermittelt werden, dass Scheibchen aus Wildtypknollen nach Inokulation und zwölfstündiger Inkubation mit Erwinien Zellen bis zu 20fach weniger Citrat aufweisen als bei Abwesenheit der Bakterien. Bei NTT-antisense Knollengewebe wurden dagegen solche Veränderungen nicht festgestellt. Hierbei muss zusätzlich erwähnt werden, dass NTT-antisense Pflanzen per se niedrige Citrat-Level aufweisen und somit geringere Veränderungen nicht überraschend sind. Vergegenwärtigt man sich, dass das Citrat-Level verglichen zum Beginn des Versuches in Wildtypgewebe nach zwölf Stunden ohne Erwinien-Zellen um einen Faktor fünf ansteigt um dann nach Inkubation mit Erwinien noch unter den Ausgangswert zu fallen, muss von starken Metabolitflüssen und einer intensiven Beeinflussung durch Erwinien-Zellen ausgegangen werden (Tab. 3.3).

3.3.1.3.3 Knollenscheibchentest mit Wildtyp und NTT-antisense Kartoffelpflanzen

Da für Citrat ein erheblicher Unterschied bezüglich Metabolitgehalt und -fluss zwischen Wildtyp und NTT-antisense Knollen festgestellt werden konnte (Kap. 3.3.1.3.2), war es interessant die bisher nur an Wildtypknollen durchgeführten Scheibchenversuche auch mit NTT-antisense Knollen zu wiederholen.

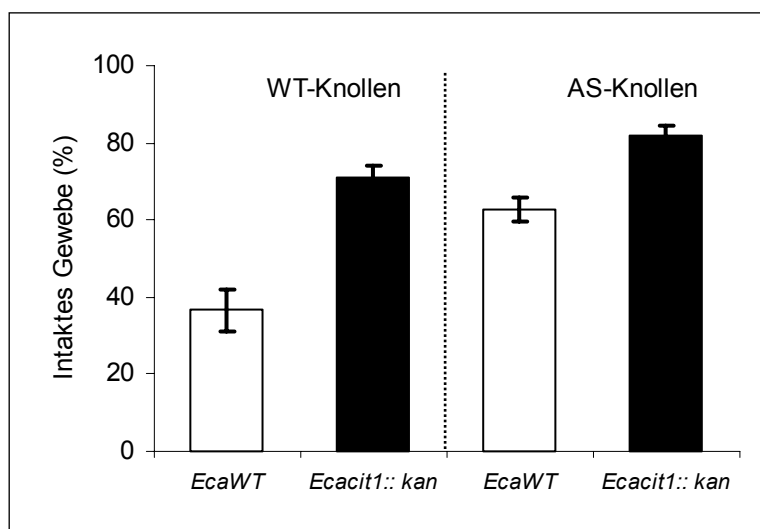


Abb. 41: Quantifizierung des durch Erwinien mazerierten Gewebes mittels Knollenscheibchentests. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt. Die für die Versuche verwendeten Knollen sind oberhalb der Balken vermerkt.

Hierbei stellte sich heraus, dass die *cit1::kan^R* Mutante die schon auf Wildtypknollen einen signifikant schwächeren Befall als der *Erwinia*-Wildtyp zeigt, auf NTT-antisense Knollenscheibchen fast nicht mehr in Lage ist einen Gewebe-Befall zu etablieren. So konnte nach Inokulation von Wildtyp Knollenscheibchen noch 76% intaktes Gewebe festgestellt werden. Auf NTT-antisense Knollenscheibchen, blieben dagegen bis zu 85% des Gewebes intakt (Abb. 41). Der *Erwinia* Wildtyp mazerierte in den gleichen Versuchen mehr als 60%

des Gewebes von Wildtyp Knollenscheibchen. NTT-antisense Scheibchen wiesen durch ihre erhöhte Resistenz ca. 65% intaktes Gewebe nach Inokulation mit Wildtyp Erwinien auf. Des weiteren verringerte sich der Unterschied in der Gewebemazerierung zwischen der *cit1::kan^R* Mutanten und dem *Erwinia* Wildtypen von ungefähr 30% auf ca. 20% (Abb. 41). Dies zeigt, dass auf NTT-antisense Knollenscheibchen, welche geringe Citrat-Gehalte aufweisen, eine Pathogenese durch Erwinien Zellen nur schwer durchführbar ist. Dies trifft besonders auf Zellen der „K.O.“-Mutante zu, die unter den hier gezeigten Bedingungen fast keine Mazerierung von Kartoffelgewebe aufweisen (Abb. 41).

3.3.1.3.4 Infiltrationsversuche an Wildtyp und NTT-antisense Kartoffelgewebe

Um die bereits unterschiedlichen Metabolit-Bedingungen von Wildtyp und NTT-antisense Knollen, im Besonderen bezüglich der Citrat-Konzentration, nochmals weiter zu variieren wurden durch Fütterungsversuche mittels Vakuum-Infiltration artifizielle Veränderungen herbeigeführt. So wurden Knollenscheibchen mit oder ohne 10mM Citrat über Nacht in MES/KOH Puffer 5,8 bei 4°C inkubiert und dann in einem Exikator infiltriert. Diese Scheibchen wurden dann wiederum für Inokulationsversuche benutzt.

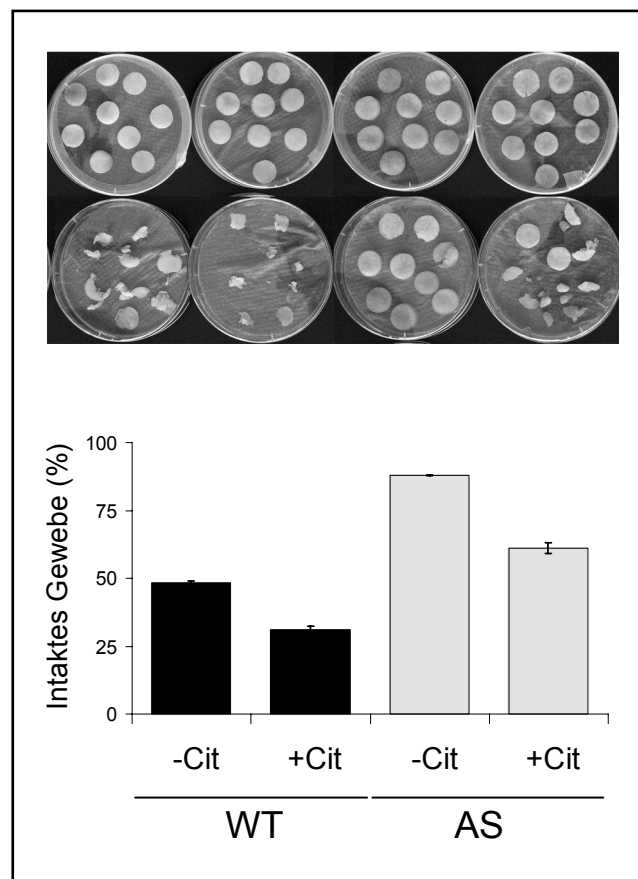


Abb. 42: Quantifizierung des durch den *Erwinia* Wildtypen mazerierten Gewebes von infiltrierten Knollenscheibchen. Oben gezeigt ist die visuelle Auswertung eines repräsentativen Versuches. Obere Reihe: Knollenscheibchen vor Abwaschen des mazerierten Gewebes. Untere Reihe: Knollenscheibchen nach Abwaschen des mazerierten Gewebes. Die Spalten entsprechen jeweils den darunter liegenden Balken des Diagramms. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standard-Abweichungen. Die bei den Versuchen verwendete Knollen sind jeweils unter den entsprechenden Balken vermerkt (WT = Wildtyp Pflanzen; AS = NTT-antisense Pflanzen). Jeweils unter den Balken ist vermerkt ob die entsprechenden Scheibchen in Gegenwart oder Abwesenheit von 10mM Citrat infiltriert worden waren.

Wie Abb. 42 zeigt, konnte sowohl bei Wildtyp als auch NTT-antisense Knollengewebe die Mazerierung durch den *Erwinia*-Wildtypen deutlich durch eine Infiltration mit 10mM Citrat gesteigert werden. So blieben nach einer apoplastischen Erhöhung des Citrat-Gehaltes nur ca. 28% an intaktem Gewebe von Wildtyp Knollenscheibchen zurück. Wurde dagegen nur mit Puffer infiltriert, konnte doppelt so viel intaktes Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 42). Erstaunlicherweise, führte eine Infiltration an NTT-antisense Knollengewebe zu einer Aufhebung der erhöhten Resistenz gegen *Eca* und dementsprechend zu einer Mazeration von bis zu 40% des Gewebes. Dies entsprach nahezu einer Verdoppelung der Virulenz des *Erwinia* Wildtypen.

Bei der *cit1::kan^R* Mutante führten Infiltrationen mit Citrat zwar zu einer leichten Erhöhung der Mazeration von Knollengewebe, diese erreichte jedoch bei Weitem nicht die Raten die bei Inokulationen mit dem *Erwinia* Wildtypen beobachtet werden konnten. So ist in Abb. 43 zu sehen, dass sowohl Wildtyp als auch NTT-antisense Knollenscheibchen nur einer schwachen Mazeration unterliegen. Des Weiteren ist die durch Erhöhung der Citrat-Konzentration bedingte Steigerung der Mazerationrate um nur etwa 10% deutlich geringer als bei Versuchen mit *Erwinia*-Wildtyp Zellen. NTT-antisense Knollen wurden durch die *cit1::kan^R* Mutante nur leicht angegriffen. Auch nach einer Citrat Infiltration konnte noch bis zu 80% an intaktem Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 43).

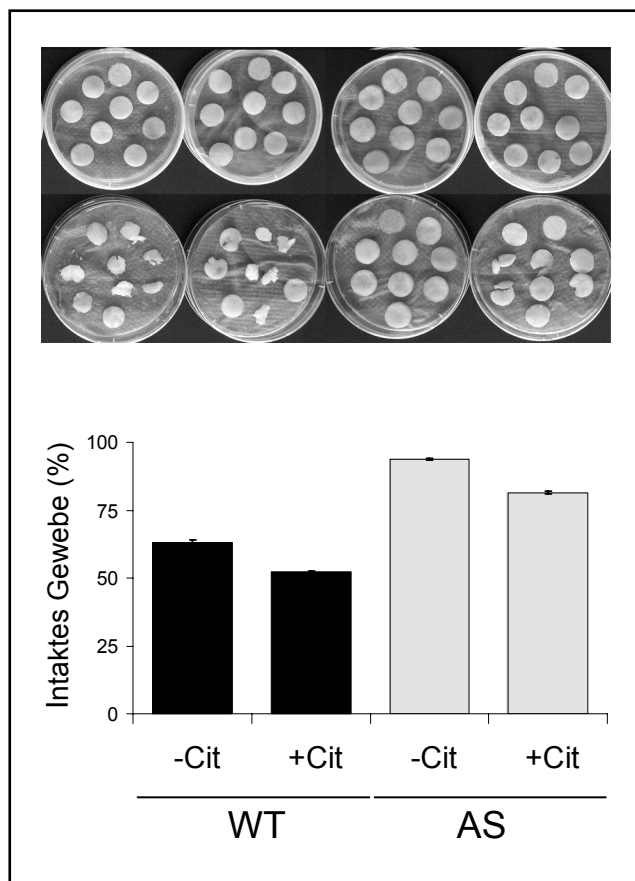


Abb. 43: Quantifizierung des durch die *Erwinia cit1::kan^R* Mutante mazerierten Gewebes von infiltrierten Knollenscheibchen. Oben gezeigt ist die visuelle Auswertung eines repräsentativen Versuches. Obere Reihe: Knollenscheibchen vor Abwaschen des mazerierten Gewebes. Untere Reihe: Knollenscheibchen nach Abwaschen des mazerierten Gewebes. Die Spalten entsprechen jeweils den darunter liegenden Balken des Diagramms. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standard-Abweichungen. Die bei den Versuchen verwendete Knollen sind jeweils unter den entsprechenden Balken vermerkt (WT = Wildtyp-Pflanzen; AS = NTT-antisense Pflanzen). Jeweils unter den Balken ist vermerkt ob die entsprechenden Scheibchen in Gegenwart oder Abwesenheit von 10mM Citrat infiltriert worden waren.

Um nun auszuschließen, dass jede Infiltration einer von *Erwinia* verstoffwechselbaren Kohlenstoffquelle zu einer Steigerung der Suszeptibilität von Knollengewebe und einer Erhöhung der Mazeration führt, wurden ergänzende Infiltrationsversuche durchgeführt. Hierbei wurde vor allem versucht, Metabolite die im Pflanzengewebe in größeren Konzentrationen vorhandene sind in das Kartoffelgewebe zu füttern. Da NTT-antisense Pflanzen nicht nur erniedrigte Citrat- sondern erhöhte Malat- und vor allem Glukosegehalte aufweisen, wurden die Infiltrationen um die letztgenannten Substrate erweitert (Tab. 3.1).

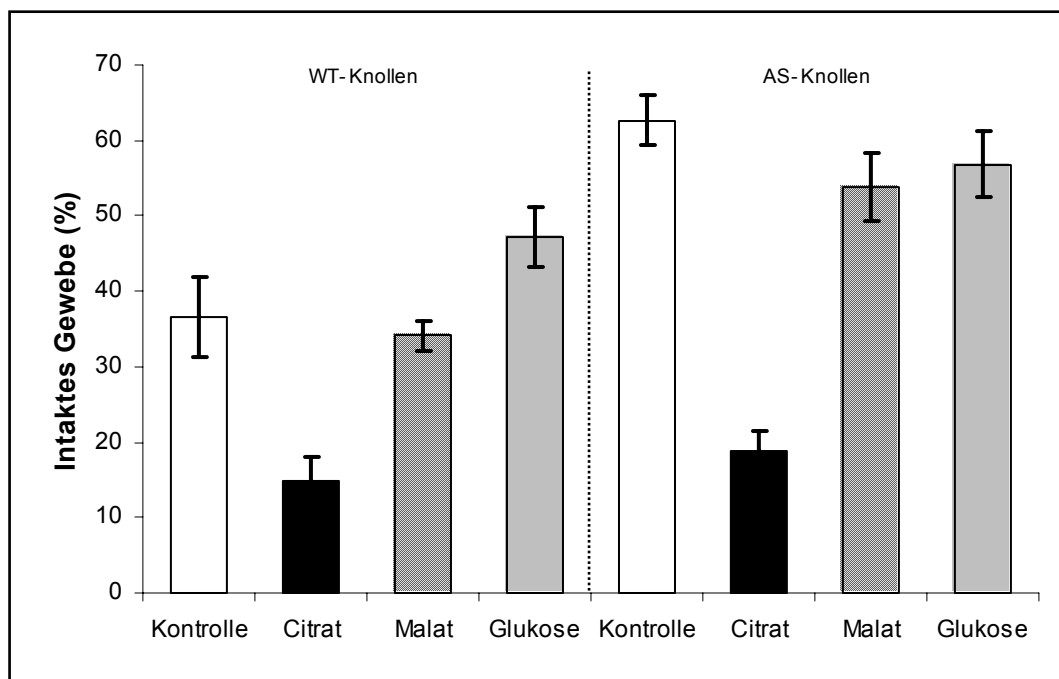


Abb. 44: Quantifizierung des durch den *Erwinia* Wildtypen mazerierten Gewebes von infiltrierten Knollenscheibchen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standard-Abweichungen. Die zum Infiltrieren verwendete Substanz ist jeweils unter den entsprechenden Balken vermerkt. Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 10mM eingesetzt. Dargestellt sind links Versuche mit Wildtyp (WT) Knollen; rechts Versuche mit NTT-antisense (AS) Knollen.

Dabei stellte sich heraus, dass ausschließlich Citrat die bisher beobachteten Auswirkungen auf die Pathogenese von Erwinien-Zellen auf Kartoffelknollen auslösen konnte (Abb. 44). Eine deutliche Steigerung der Mazerationseffizienz konnte nur bei Infiltrationen mit 10mM Citrat bei den benutzten Knollenscheibchen festgestellt werden. Alle anderen im Versuch eingesetzten Substanzen wie Malat oder Glukose zeigten keine oder nur leichte Veränderungen hinsichtlich der Mazeration von Knollengewebe. So pendelte sich die Menge an intaktem Gewebe nach Infiltration mit 10mM Malat oder 10mM Glukose von Wildtyp-Knollen und folgender Inokulation mit dem *Erwinia* Wildtypen zwischen ungefähr 35-45% ein (Abb. 44). Dieser Wert konnte auch beobachtet werden, wenn Knollenscheibchen nur mit

Puffer infiltriert worden waren. Auch bei NTT-antisense Knollen konnten die Mazerationen von 25% durch den *Eca* Wildtypen nicht durch die Erhöhung der Malat- und Glukose-Konzentrationen gesteigert werden. Eine Infiltration mit 10mM Citrat führte dagegen wieder zu einer drastischen Erhöhung der Gewebe-Mazeration. Hier blieben nach Inokulation mit Wildtyp-Zellen nur noch ungefähr 15-20% an intaktem Gewebe übrig.

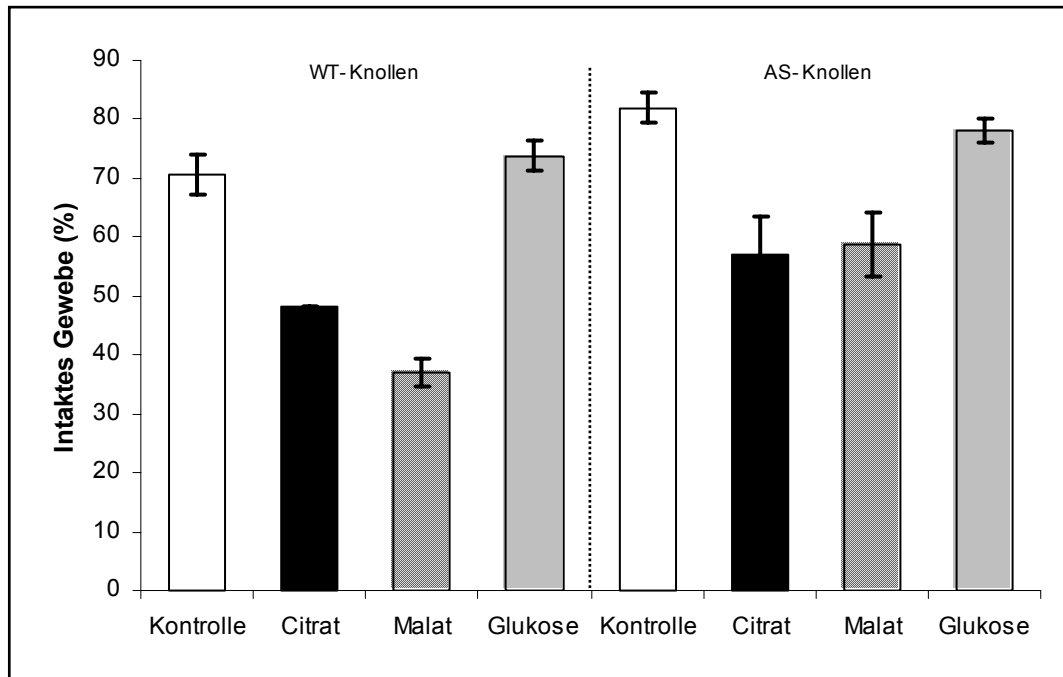


Abb. 45: Quantifizierung des durch die *Erwinia cit1::kan^R* Mutante mazerierten Gewebes von infiltrierten Knollenscheibchen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standard-Abweichungen. Die zum Infiltrieren verwendete Substanz ist jeweils unter den entsprechenden Balken vermerkt. Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 10mM eingesetzt. Dargestellt sind links Versuche mit Wildtyp (WT) Knollen; rechts Versuche mit NTT-antisense (AS) Knollen.

Bei analogen Versuchen mit der *Erwinia cit1::kan^R* Mutante, konnten solch extreme Steigerungen der Mazeration durch Citrat nicht erreicht werden (Abb. 45). Zwar verringerten sich auch hier die beobachteten Werte an intaktem Gewebe durch Citrat-Infiltration nach Inokulation, erreichten jedoch nie jene, die bei Inokulationen mit *Erwinia* Wildtypen gemessen wurden (Abb. 44 und Abb. 45). Eine Infiltration mit Glukose hatte sowohl bei Wildtyp- als auch bei NTT-antisense Knollenscheibchen keinen Effekt auf die Mazeration durch die *cit1::kan^R* Mutante und hinterließen um die 75% an intaktem Gewebe (Abb. 45). Interessanterweise konnte durch eine Infiltration von Malat eine mit dem *Erwinia*-Wildtyp vergleichbare Virulenz auf *S.tuberosum* Wildtyp und NTT-antisense Knollen wieder hergestellt werden (Abb. 45). Generell zeigte die *cit1::kan^R* Mutante mit einer maximalen Mazervationsrate von um die 50% deutlich geringere Werte als beim *Erwinia* Wildtypen mit 75%. Dies war besonders bei mit Puffer oder 10mM Glukose infiltrierten Scheibchen der Fall,

die durch die „K.O.“-Mutane kaum angegriffen wurden und einen Anteil an mazeriertem Gewebe von nur ca. 17% aufwiesen.

3.3.2 ECA4400, ein weiterer putativer Karbonsäure-Transporter?

3.3.2.1 Molekulare Charakterisierung

Ein weiteres Homolog der *Eca3984* Gensequenz, war der *Eca4400* Locus. Dieser besitzt eine überaus große Ähnlichkeit zu der im vorangegangenen Kapitel bereits charakterisierten und als *cit1* bezeichneten DNA-Sequenz. Für das *cit1* Genprodukt konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen hoch-affinen Citrat/Protonen Symporter handelt, der für ein Wachstum auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle unabdingbar ist und eine große Bedeutung für *Erwinia* bei Befall von Kartoffelgewebe hat. Eine molekulare Charakterisierung eines weiteren Homologes, wie der *Eca4400* Sequenz ist also überaus interessant. Auch das *Eca4400* Genprodukt wird als Natrium gekoppelter Sulfat-Transporter eingeordnet, wobei nach den vorangegangenen Studien, eine Funktion als Karbonsäuretransporter durchaus möglich ist. Auch in diesem Falle, ist die Herstellung einer „K.O.“-Mutante die Voraussetzung zur Aufklärung von Funktion und Bedeutung dieser Sequenz für *Erwinia*. Deshalb wurde ein weiteres „K.O.“-Konstrukt für das entsprechende Gen hergestellt (pCU29.1). Auch hierbei war die Ermittlung von Abfolge und Orientierung der entsprechenden DNA-Bereiche ausgehend von verschiedenen Primerpaaren und PCR-Analysen notwendig (Abb. 46). So konnte mittels einer Gen-spezifischen Primerkombination (4400s/4400as) die Insertion der Kanamycin-Resistenz Kassette und die Unterbrechung des Genes klar nachgewiesen werden (Abb. 46). Hierbei konnte ein Fragment von ungefähr 2312 Basenpaaren amplifiziert werden (Vergleiche Abb. 47). Der Resistenzmarker selbst konnte nochmals mittels den Resistenz-spezifischen Primern (Ks/Kas) nachgewiesen werden.

Auch hier mussten die zwei möglichen Orientierungen, die bei Insertion des Resistenzmarkers vorliegen können, mittels den entsprechenden Primerpaarungen, die sich aus jeweils einem Gen-spezifischen und einem Resistenz-spezifischen Primer ergeben, auf die zutreffende beschränkt werden. Hierbei konnte jeweils bei zwei dieser Paarungen ein charakteristisches PCR-Produkt nachgewiesen werden, wohingegen die verbleibenden zwei kein Produkt lieferten. Abb. 47 zeigt, dass sowohl bei der Primerkombination 4400s/Kas als auch 4400as/Ks ein Produkt identifiziert werden konnte. Die amplifizierten Fragmente entsprachen mit 1437 und 1976 Basenpaaren ebenfalls den erwarteten Größen. Die beiden verbleibenden Primerkombinationen 4400s/Kas und 4400as/Ks lieferten dagegen kein Produkt. Hieraus konnte das in Abb. 47 gezeigte Orientierungsschema abgeleitet werden. Als Kontrolle wurden die bei der PCR erzeugten Amplifikate mittels Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

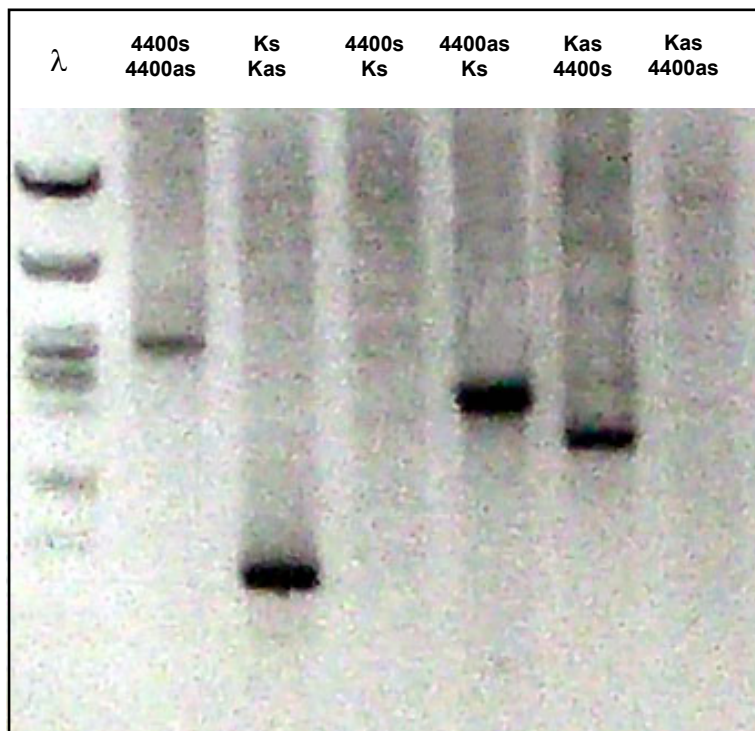


Abb. 46: PCR-Analyse des *Eca4400* „K.O.“-Konstruktes. Gezeigt ist ein Agarosegel auf dem PCR-Reaktionsansätze aufgetragen und aufgetrennt wurden. Die verschiedenen Ansätze beinhalten unterschiedliche Primer-Paare. Die Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurde das als pCU29.1 bezeichnete Plasmid benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λ DNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

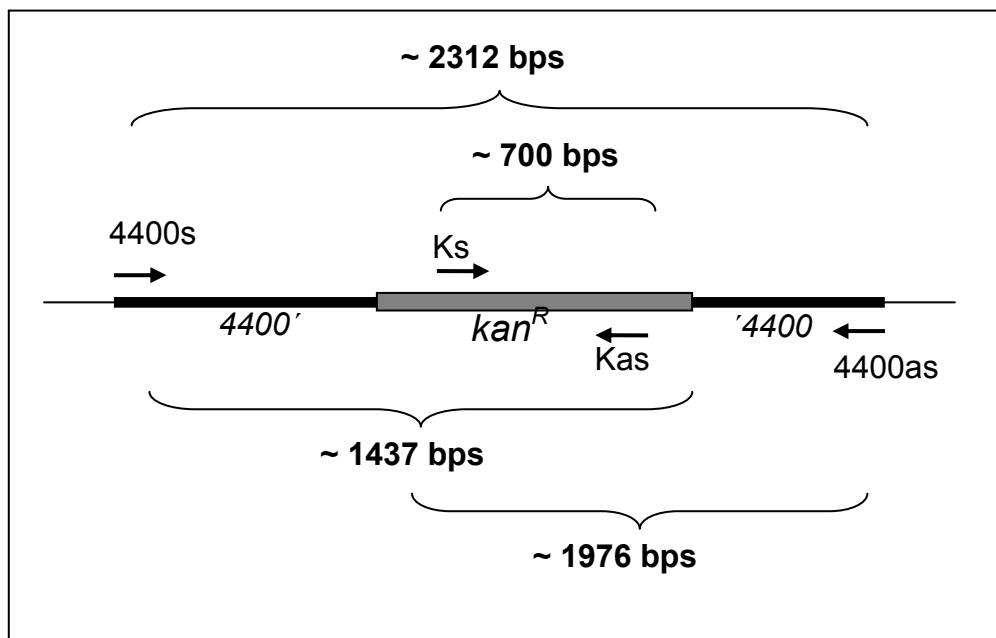


Abb. 47: Orientierungsschema der „K.O.“-Kassette. Gezeigt sind die Orientierungen des *Eca4400* Lokus und der Kanamycin-Resistenz Kassette (*kan^R*). Die Bezeichnung der jeweiligen Primer ist oberhalb ihrer durch Pfeile markierten Bindestellen angegeben. Die zu erwartenden PCR-Produkte bei entsprechenden Primer-Paarungen sind durch Klammern gekennzeichnet. Die Länge korrespondierender DNA-Fragmente ist oberhalb der Klammern vermerkt.

Nach der Transformation von kompetenten *Eca* Zellen mit dem pCU29.1 Vektor konnten fünf putative „K.O.“-Mutanten isoliert werden. Drei dieser fünf putativen Mutanten wurden nach Antibiotika-Selektion als Insertionsmutanten die aus einem „double crossing-over“ hervorgingen verifiziert (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend zeigten Sie ein Wachstum auf Kanamycin jedoch nicht auf Ampicillin. Diese verifizierten *Eca4400* Insertionsmutanten wurden zwecks Bestätigung weiteren PCR-Analysen unterzogen. Anhand des Orientierungsschemas (Abb. 47) wurde dementsprechend ein charakteristisches Produkt-Muster als Referenz festgelegt. Auch hier zeigten alle drei getesteten Mutanten ein einheitliches Muster (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Analysen wird daher nur eine dieser Mutanten beschrieben.

Wie Abb. 48 zeigt, bestätigten PCR-Analysen das „Ausknocken“ des *Eca4400* Lokus. Hierbei zeigte eine Gen-spezifische Primerkombination (4400s/4400as), dass die kodierende *Eca4400*-Sequenz um die Kanamycin Resistenz-Kassette verlängert war. Die gleiche Primerkombination führte beim *Erwinia* Wildtypen zur Amplifikation des intakten *Eca4400* Gen-Lokus. Auch die Kanamycin-Resistenz konnte mittels den Resistenz-spezifische Primern bei der Mutante nachgewiesen werden. Eine Reaktion mit Wildtyp-Zellen führte zu keinem Produkt. Schlussendlich brachten die beiden charakteristischen Gen/Resistenz spezifischen Primerkombinationen bei der Mutante die erwarteten PCR-Produkte hervor, beim Wildtypen dagegen keine.

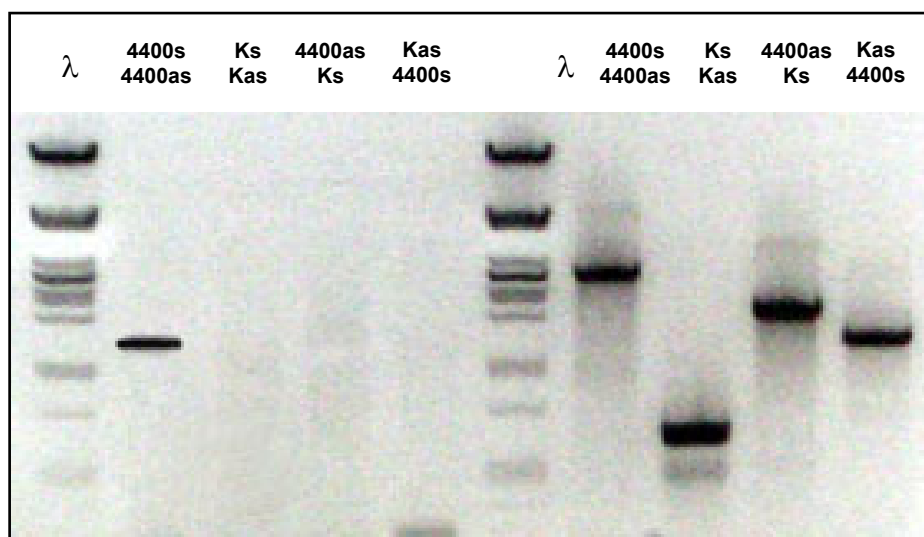


Abb. 48: PCR-Analyse zur Überprüfung der *Eca4400::kan^R* „K.O.“-Mutante und Bestätigung der Lokus-Insertion. Gezeigt ist ein Agarosegel mit entsprechenden Reaktionsansätzen. Die benutzten Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurden *Eca*-Wildtyp als auch *Eca4400::kan^R* Zellen benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Da diese Mutante erst kurz vor Ende dieser Arbeit erzeugt wurde, konnte bis zum diesem Zeitpunkt noch keine Test-PCR entsprechend der Überprüfung nach Insertion am richtigen Gen-Lokus durchgeführt werden. Nach bisherigen Analysen spricht jedoch alles für ein „Ausknocken“ der *Eca4400* Gensequenz am richtigen Genlokus.

3.3.2.2 Biochemische Charakterisierung

Durch die unter Kap. 3.3.1.2.1 durchgeführten Sequenzanalysen konnten zwei weitere Homologe Proteine zum Cit1 Protein in *Eca* identifiziert werden (Abb. 29). Für eines dieser Homologe ECA4400 wurde wie im vorangegangenen Abschnitt (Kap. 3.3.2.1) beschrieben, eine erfolgreiche „K.O.“-Mutagenese durchgeführt. Da das Cit1 Protein bereits als ein hoch-affiner Protonen abhängiger Citrat-Transporter identifiziert und charakterisiert werden konnte, liegt es nahe die homologen Genprodukte und die erzeugte Mutante für die *Eca4400* Sequenz hinsichtlich Citrat-Verwertung zu untersuchen.

3.3.2.2.1 Citrat-Verwertung

Wie bereits für die *Eca3984* Insertionsmutante (*cit1::kan^R*) wurde auch zur Bestimmung von Citrat-Verwertung und Wachstum für die *Eca4400* Insertionsmutante das unter Kap. 3.3.1.2.2 beschriebene Simmons Citrat Medium (SCM) benutzt.

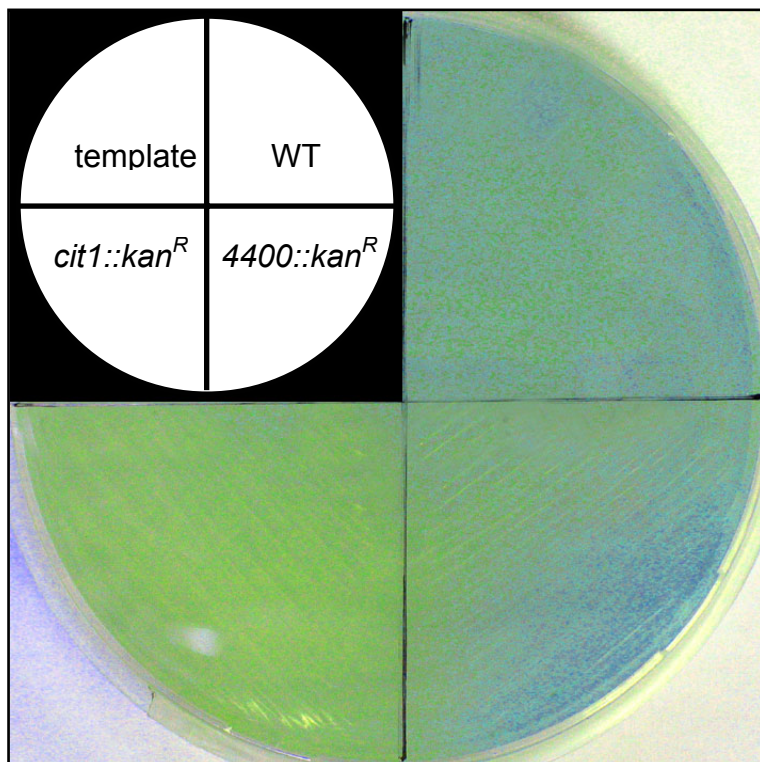


Abb. 49: Wachstumstest auf Simmons Citrat Medium (SCM). Ausstrich von entsprechenden *Erwinia* Zellen auf SCM-Platten. Gezeigt ist die visuelle Auswertung nach einer Inkubation von 48h bei 30°C. Linkes oberes Viertel: Schablone zur Identifizierung der jeweiligen Bakterien-Kultur. Ausgestrichene Kulturen: WT = *Eca* Wildtyp; *cit1::kan^R* = *Eca3984* Insertionsmutante; *4400::kan^R* = *Eca4400* Insertionsmutante.

Wie in Abb. 49 zu sehen ist, kann neben der positiven Citratverwertung durch den *Erwinia* Wildtypen und der negativen durch die *cit1::kan^R* Insertionsmutante eine mehr oder weniger schwach positive Citratverwertung der *Eca4400::kan^R* Mutante beobachtet werden. Hierbei konnte bei Ausstrich des *Erwinia* Wildtypen eine deutliche Blaufärbung und Wachstum festgestellt werden. Wie schon gezeigt, kann für die *cit1::kan^R* Mutante hingegen kein Wachstum auf Citrat festgestellt werden. Die *Eca4400* „K.O.“-Mutante zeigt zwar ein schlechteres Wachstum als der *Erwinia* Wildtyp auf SCM Medium, wächst jedoch deutlich besser als die *cit1* Mutante. Um genauere Aussagen zu treffen, müssten Citrat Transportmessungen durchgeführt werden. Diese konnten jedoch, bedingt durch den späten Zeitpunkt der Herstellung dieser Mutante nicht mehr angegangen werden.

3.3.2.3 Phytopathologische Charakterisierung

Eine Untersuchung der phytopathologischen Eigenschaften der neu erzeugten *Eca4400::kan^R* Mutante wurde dennoch durchgeführt, um eine Einschätzung der Fitness und der Virulenz dieser Mutante bei Knollenscheibchen Experimenten zu bekommen. Dementsprechend wurden die Mazeration von Wildtyp Knollenscheibchengewebe nach Inokulation mit dem *Erwinia* Wildtypen und der *Eca4400::kan^R* Mutante untersucht.

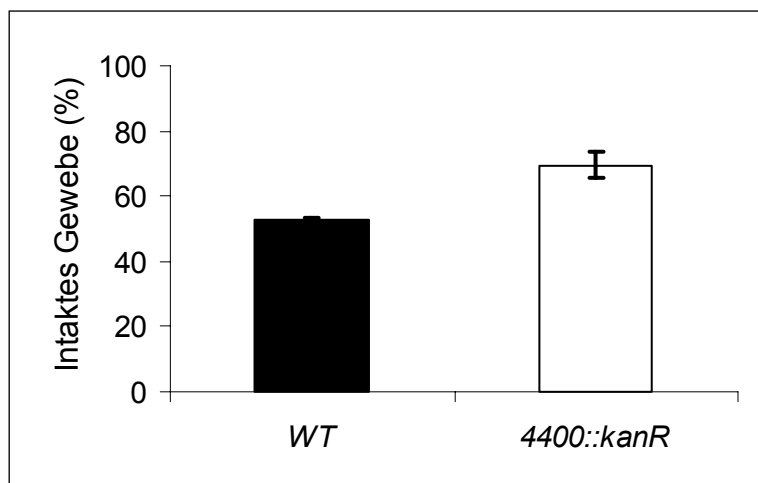


Abb. 50: Quantifizierung des durch *Erwinien* mazerierten Gewebes mittels Knollenscheibchentests. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt.

Auch bei dieser Mutante konnte ein schwächerer Befall als durch den *Erwinia* Wildtypen festgestellt werden. In Knollenscheibchenexperimenten blieben nach Mazeration durch Wildtyp-Zellen 50±0,5 Prozent intaktes Gewebe zurück, bei Knollen welche mit *Eca4400::kan^R* Zellen inokuliert wurden dagegen 69±4 Prozent. Somit zeigt die *Eca4400* Insertionsmutante eine schwächere Mazeration von Knollengewebe als der Wildtyp, weist jedoch eine höhere Virulenz auf als die *cit1::kan^R* Mutante (Vergleiche Abb. 39).

3.3.3 ECA0620, ein anaerober Malat-Carrier

Neben den unter Kap. 3.3.1 beschriebenen Citrat-Transportern und weiteren homologen Mitglieder dieser Transportergruppe (Kap. 3.3.2) besitzen Enterobakterien weitere Möglichkeiten zur Karbonsäure-Aufnahme. So ist beispielsweise *E.coli* in der Lage C4-Karbonsäuren sowohl aerob als auch anaerob als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Hierbei erfolgt die Karbonsäure-Aufnahme unter aeroben Bedingungen durch das Dct-System. Die anaerobe Aufnahme, der Austausch als auch Export dieser C4-Dicarboxylate (Fumarat, Malat, Maleat und Succinat) wird durch die drei unabhängigen Transportsysteme, DcuA, DcuB und DcuC, vermittelt. Da auch *Erwinia* diese Aufnahmesysteme besitzt und der Karbonsäurehaushalt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese zu spielen scheint (Kap. 3.3.1), wurde versucht einen dieser vier Transporter im Folgenden auszuknocken. Hierbei sollte der *Eca0620* Locus, Ziel einer Insertionsmutagenese sein.

3.3.3.1 Molekulare Charakterisierung

Der Genlocus *Eca0620* kodiert in *Erwinia* für ein Homolog des bei *E.coli* bereits charakterisierten DcuA-Proteins, einem anaeroben C4-Carboxylat Transporter. Dieser Gen-Locus wurde also als Ziel einer Insertionsmutagenese zur Herstellung einer weiteren „K.O.“-Mutante bezüglich des Karbonsäurestoffwechsels gewählt. Hierzu wurde wie in den vorangegangenen Fällen ein „K.O.“-Konstrukt benötigt (pCU28.1). Zur Ermittlung von Abfolge und Orientierung der entsprechenden DNA-Bereiche wurden wiederum die entsprechenden PCR-Reaktionen durchgeführt (Abb. 51). Mittels einer Gen-spezifischen Primerkombination (dcuAs/dcuAas) konnte die zur Mutagenese benutzte „K.O.“-Kassette deutlich nachgewiesen werden (Abb. 51). Hierbei konnte ein Fragment von ca. 2700 Basenpaaren amplifiziert werden (Vergleiche Abb. 52). Auch der Resistenzmarker selbst, konnte mittels Resistenz-spezifischen Primern (Ks/Kas) nachgewiesen werden.

Zur Feststellung der entsprechenden Orientierungen der Insertion in der kodierenden DNA-Sequenz wurden wie bereits beschrieben, PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass nur zwei dieser Paarungen (dcuAs/Kas; dcuAas/Ks) charakteristisch für die vorliegende Orientierung der Kanamycin-Insertion waren und ein Produkt generierten. Die verbleibenden zwei Kombinationen lieferten dagegen kein spezifisches Amplifikat. Die amplifizierten Fragmente aus Reaktionen der charakteristischen Primerkombinationen wiesen ebenfalls die erwarteten Größen von 2159 und 1859 Basenpaaren auf. Dementsprechend wurde das in Abb. 52 gezeigte Orientierungsschema

abgeleitet. Als Kontrolle wurden die bei der PCR erzeugten Amplifikate mittels Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

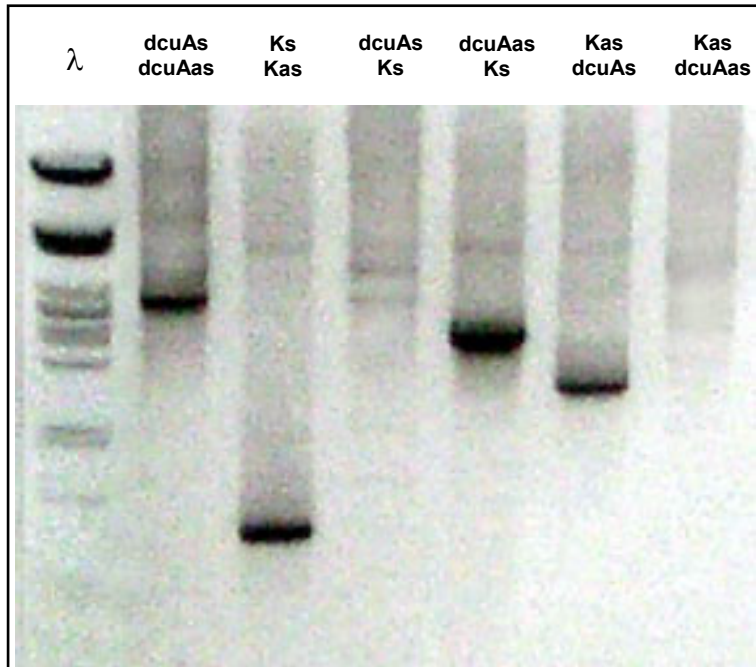


Abb. XX: PCR-Analyse des *Eca0620* (*dcuA*) „K.O.“-Konstruktes. Gezeigt ist ein Agarosegel auf dem PCR-Reaktionsansätze aufgetragen und aufgetrennt wurden. Die verschiedenen Ansätze beinhalten unterschiedliche Primer-Paare. Die Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurde das als pCU28.1 bezeichnete Plasmid benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λ DNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

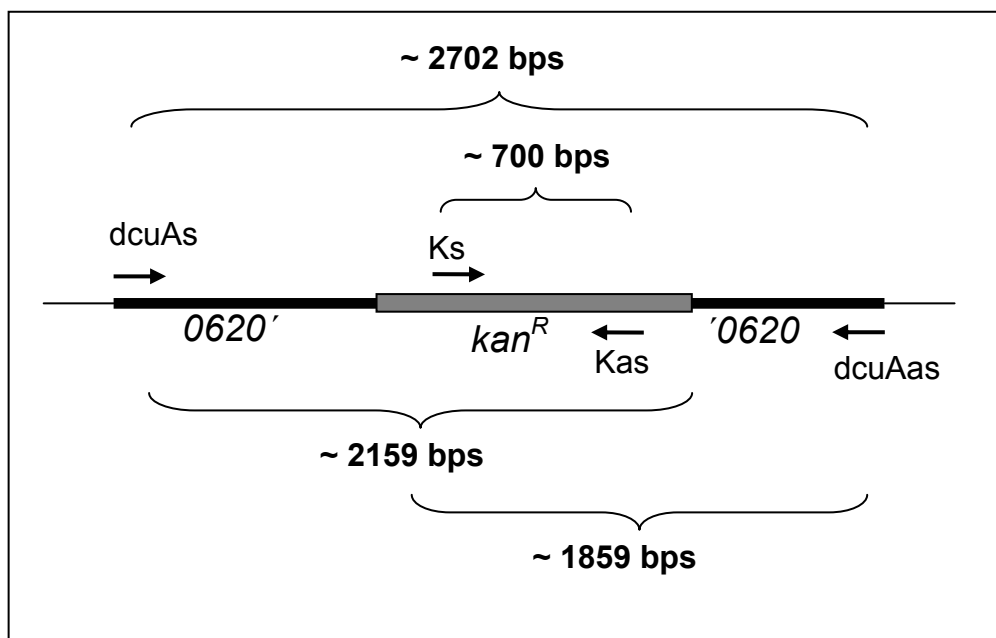


Abb. 52: Orientierungsschema der „K.O.“-Kassette. Gezeigt sind die Orientierungen des *Eca0620* Locus (*dcuA*) und der Kanamycin-Resistenz Kassette (*kan^R*). Die Bezeichnung der jeweiligen Primer ist oberhalb ihrer durch Pfeile markierten Bindestellen angegeben. Die zu erwartenden PCR-Produkte bei entsprechenden Primer-Paarungen sind durch Klammern gekennzeichnet. Die Länge korrespondierender DNA-Fragmente ist oberhalb der Klammern vermerkt.

Nach der Transformation von kompetenten *Eca* Zellen mit dem oben beschriebenen Konstrukt (pCU28.1), konnten acht putative „K.O.“-Mutanten isoliert werden. Nach Selektion auf Ampicillin und Kanamycin wurden drei dieser acht Mutanten als Insertionsmutanten, welche aus einem „double crossing-over“ hervorgegangen sind, zurückbehalten (Daten nicht gezeigt). Alle drei Transformanden zeigten Wachstum auf Kanamycin jedoch nicht auf Ampicillin. Diese drei Mutanten wurden im Folgenden weiteren PCR-Analysen unterzogen. Mittels des Orientierungsschemas (Abb. 52) konnte wiederum ein charakteristisches Produkt-Muster als Referenz zur Bestätigung von Insertionsmutanten benutzt werden. Alle untersuchten Mutanten zeigten hierbei ein nahezu identisches Muster (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Analysen wird daher nur eine dieser Mutanten beschrieben.

Wie Abb. 53 zeigt, bestätigten auch die weiteren PCR-Analysen das „Ausknocken“ des *Eca0620* Locus. So konnte mittels Gen-spezifischen Primern (dcuAs/dcuAas) die durch Insertion verlängerte und somit unterbrochene Gen-Sequenz nachgewiesen werden (Abb. 53). Die gleiche Primerkombination führte beim *Erwinia* Wildtypen zur Amplifikation eines intakten *Eca0620* Genes. Des Weiteren wurde die Kanamycin-Resistenz durch Resistenz-spezifische Primer nur bei der Mutante nachgewiesen. Des Weiteren lieferten auch die Gen/Resistenz spezifischen Primerkombinationen beim Wildtypen keine Produkte, erlaubten jedoch bei der *Eca0620::kan^R* Mutante die Amplifikation der charakteristischen Produkte. Demnach kann von einer erfolgreichen Mutagenese für den *Eca0620* Locus ausgegangen werden.

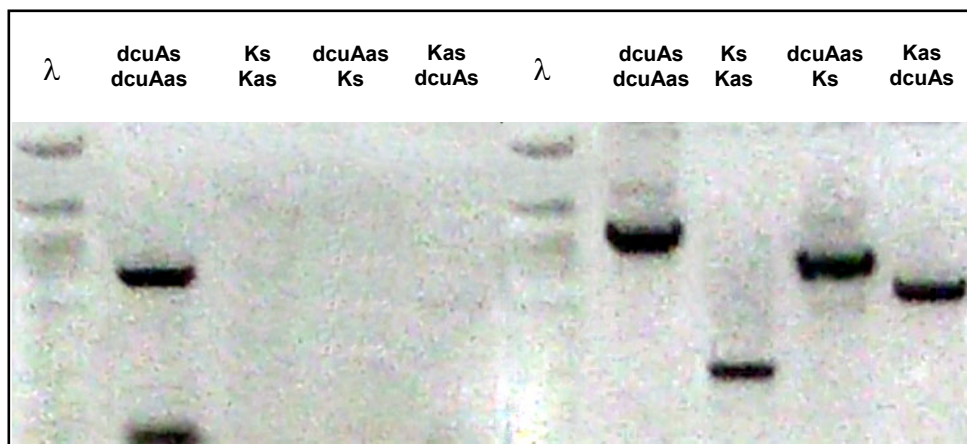


Abb. 53: PCR-Analyse der *Eca0620::Kan^R* „K.O.“-Mutante. Gezeigt ist ein Agarosegel mit entsprechenden Reaktionsansätzen. Die benutzten Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurden *Eca*-Wildtyp als auch *Eca0620::kan^R* Zellen benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Da auch diese Mutante erst zum Schluss der hier vorliegenden Arbeit fertig gestellt wurde, konnte bisher noch keine PCR-Analyse zur Überprüfung der räumlichen Lokalisierung nach Rekombination durchgeführt werden.

3.3.3.2 Biochemische Charakterisierung

Da wie unter Kap. 3.3.1.2.4 beschrieben, Malat sowie andere C4-Dicarboxylate einen geringen Effekt auf die Citrat-Aufnahme gezeigt haben (Abb. 34; Abb. 35), wurde eine Charakterisierung der Aufnahme von C4-Carboxylate für den *Erwinia* Wildtypen durchaus interessant.

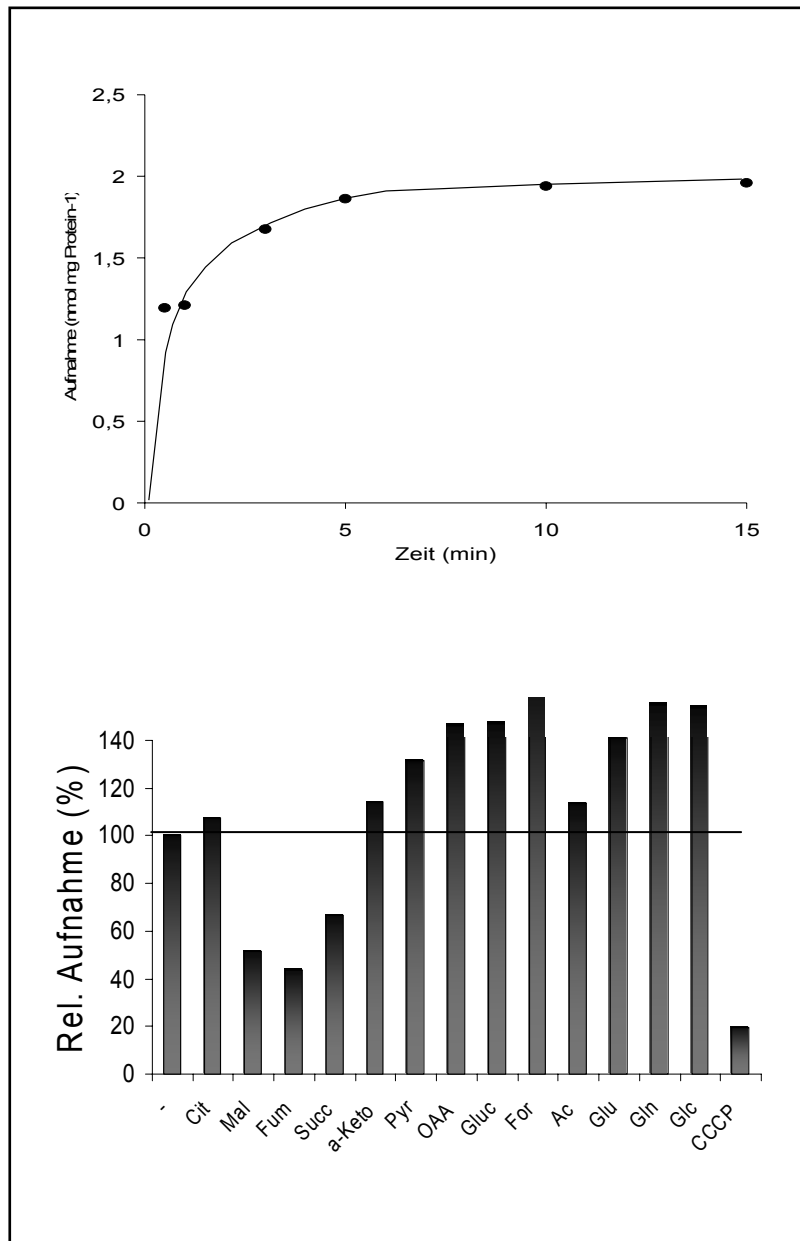


Abb. 54: Zeitabhängigkeit der [1,4-¹⁴C] Malat-Aufnahme an intakten Erwinien-Zellen. Die benutzten Zellen wurden in Vollmedium bei 30°C angezogen. Die gezeigten Transportversuche wurden mit Wildtyp (●) Zellen bei einer Malat-Konzentration von 15μM und einer Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt. Die gezeigten Werte entsprechen jeweils Mittelwerten aus Triplikaten dreier unabhängiger Versuche.

Abb. 55: Effektorversuche an intakten Erwinien-Zellen. Die benutzten Zellen wurden in Vollmedium bei 30°C angezogen. Transportversuche wurden mit Wildtyp Zellen bei einer Malat-Konzentration von 15μM und einer Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt. Effektoren wurden im zehnfachen Überschuss (150μM) eingesetzt. Als Bezugswert wurde ein Ansatz ohne Effektor benutzt dessen Aufnahme als 100% definiert wird. Die gezeigten Werte entsprechen jeweils Mittelwerten aus Triplikaten dreier unabhängiger Versuche.

Hierzu wurden anfänglich Transportversuche an intakten *Erwinia* Wildtyp-Zellen mit radioaktiv markiertem Malat durchgeführt. Die für die Versuche benutzten Zellen wurden in LB-Vollmedium unter Schütteln bei 30° angezogen. Bei den entsprechenden Versuchen konnte wie in Abb. 54 gezeigt eine zeitabhängige Aufnahme von Malat in Wildtyp Zellen

festgestellt werden. Diese stieg in den ersten zwei Minuten relativ schnell an, um dann nach etwa fünf Minuten in eine Sättigung einzutreten. Mit dieser Sättigung wurde eine Transportrate von ca. $2 \text{ nmol mg} \cdot \text{Protein}^{-1}$ erreicht. Damit tritt der Malat-Transport in Wildtyp *Erwinien* im Gegensatz zum Citrat-Transport später in die Sättigungsphase ein und erreicht höhere maximale Transportraten bei gleicher Substratkonzentration (Vergleiche Abb. 33). Um den Transport weiter zu charakterisieren und sicherzustellen, dass der Malat- und Citrat-Transport über verschiedene Aufnahmesysteme bewerkstelligt werden, wurden weitere Effektorversuche durchgeführt. So ist in Abb. 55 zu sehen, dass das Substrat-Spektrum der Malat-Aufnahme sich deutlich vom Substrat-Spektrum der Citrat-Aufnahme unterscheidet (Abb. 34). So übte Citrat keinerlei Einfluss auf die Malat-Aufnahme aus. Weiterhin konnte die Malat-Aufnahme durch die Zugabe eines großen Anteiles der getesteten Karbonsäure deutlich gesteigert werden. Zudem zeigt Abb. 55, dass Malat durch Zugabe von nicht markiertem Malat auf bis zu 50% verdrängt werden kann. Einen weiteren reduzierenden Einfluss auf die Aufnahme zeigten Fumarat und Succinat. Diese Karbonsäuren scheinen also auch putative Substrate eines Malat-Transportes in *Eca* zu sein. Mit Sicherheit kann durch die gezeigten Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass Citrat und Malat über verschiedene Transportsysteme aufgenommen werden.

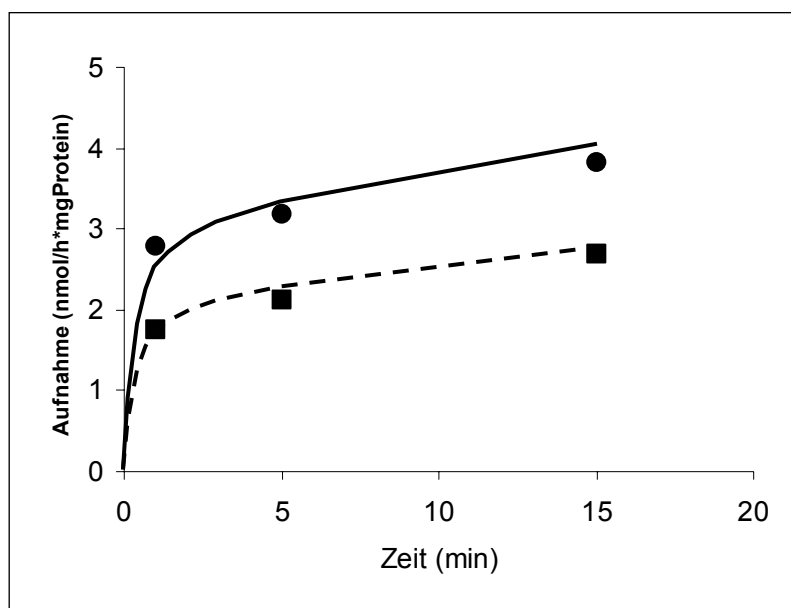


Abb. 56: Zeitabhängigkeit der [1,4- ^{14}C] Malat-Aufnahme an intakten *Erwinien*-Zellen. Die benutzten Zellen wurden in Vollmedium bei 30°C angezogen. Die gezeigten Transportversuche wurden mit Wildtyp (\bullet) und *Eca0620::kan^R* (\blacksquare) Zellen bei einer Malat-Konzentration von $15\mu\text{M}$ und einer Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt. Die gezeigten Werte entsprechen jeweils Mittelwerten aus Triplikaten dreier unabhängiger Versuche.

Weitere Aufnahmeversuche mit radioaktiv markiertem Malat an Wildtyp und *Eca0620::kan^R* Zellen sollten die anteiligen Aufnahmen des ECA0620 Proteins an dem beobachteten Malat-Transport zeigen. So konnte tatsächlich gezeigt werden, dass die *Eca0620* „K.O.“-Mutante bei einer zeitabhängigen Aufnahme, weniger markiertes Malat akkumuliert, als der *Eca* Wildtyp. Demnach erreichte der *Eca* Wildtyp nach 15 Minuten eine maximale Aufnahmerate von bis zu $3,5 \text{ nmol Malat pro Stunde und mg Protein}$.

Eca0620::kan^R Zellen zeigten dagegen zum gleichen Zeitpunkt nur Transportraten von 2,4 nmol Malat pro Stunde und mg Protein. Der Unterschied in der Malat-Aufnahme wirkte sich weiterhin nur auf die maximale Transportrate aus. Die anfängliche Aufnahme von Malat vor dem Erreichen einer Sättigung verlief sowohl für den *Eca* Wildtypen als auch für die *0620::kan^R* Mutante gleich, was wie schon weiter oben beschrieben auf die Existenz mehrere redundanter Transportsysteme für Malat hindeutet.

3.3.3.3 Phytopathologische Charakterisierung

Um die *Eca0620* Mutante aufgrund ihrer Fähigkeiten Kartoffelgewebe anzugreifen und zu mazerieren genauer zu untersuchen, wurde eine direkte Überprüfung der Virulenz auf Knollenscheibchen gewählt.

Hierbei wurde festgestellt, dass die *Eca0620* Insertionsmutante keinen signifikanten Unterschied in der Mazerationseffizienz, im Vergleich zum Wildtypen, aufweist.

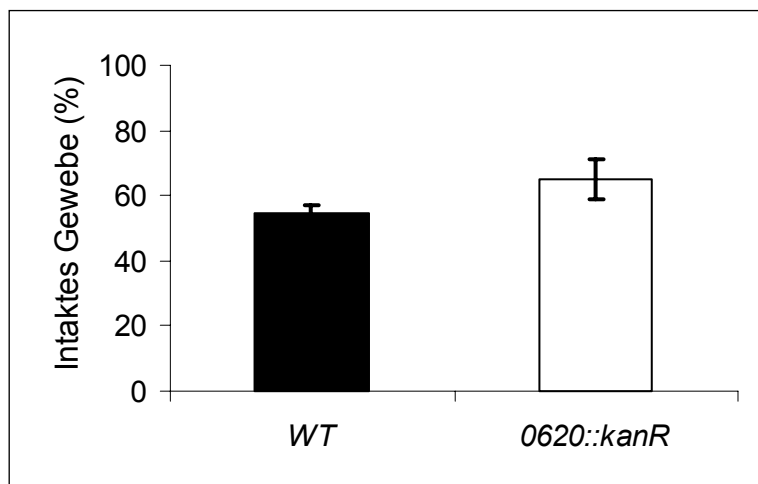


Abb. 57: Quantifizierung des durch Erwinien mazerierten Gewebes mittels Knollenscheibchentests. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt.

Auch wenn eine Tendenz zu einem leicht schwächeren Befall beobachtet werden konnte, so belief sich der Unterschied dennoch nur auf 6 bis 12 Prozent. So blieben in Knollenscheibchenexperimenten nach Mazeration durch Wildtyp-Zellen 54±2,8 Prozent intaktes Gewebe zurück, bei Knollen welche mit *Eca0620::kan^R* Zellen inokuliert worden waren, dagegen 65±5,9 Prozent. Dementsprechend sind für eine genaue Einschätzung der Virulenz dieser Mutante zwar weitere Versuche notwendig, eine signifikant schwächere Virulenz als die des Wildtypen war, in den vorliegenden Versuchen jedoch nicht zu beobachten.

3.3.4 ECA2207; Regulator anaerober Stoffwechselprozesse

Bei der molekularen Charakterisierung des *cit1* Lokus, konnte durch in-silico Analysen eine Promotor Bindestelle für das FNR Protein (Fumarate-Nitrate-Respiration Regulator) festgestellt werden. Hierbei handelt es sich um ein Regulatorprotein, welches bei Enterobakterien ubiquitär verbreitet ist. Als Mitglied dieser Bakterien-Gruppe ist auch *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* ein fakultativer Organismus, der sowohl auf Zuckern durch Fermentation oder aber durch Atmung mit Hilfe externer Elektronen-Akzeptoren wachsen kann. Als fakultativ anaerobes Bakterium ist der Wechsel und Umgang mit anaeroben als auch aeroben Bedingungen möglich. Das Umschalten zwischen diesen Bedingungen wird von drastischen Veränderungen der Genexpression begleitet. Zwei Proteine spielen bei diesen Veränderungen eine tragende Rolle. Zum einen das zum Zwei-Komponenten System (ArcA/ArcB) gehörende ArcA Protein (Aerobic Respiratory Control), ein Helix-turn-Helix aufweisendes DNA-Bindeprotein und zum Anderen, das FNR-Protein. Hierbei handelt es um einen eisenabhängigen DNA-bindenden Regulator.

3.3.4.1 Molekulare Charakterisierung

Durch die in den vorangegangenen Kapiteln charakterisierten „K.O.“-Mutanten zum Karbonsäuretransport und neueren Indizien, dass möglicherweise der Karbonsäurehaushalt unter anaeroben Bedingungen (wie sie bei Befall von Kartoffelknollen vorliegen) eine wichtige Rolle bei der Pathogenese zu spielen scheint, stellte das „Ausknocken“ des FNR-Proteins eine elegante Überprüfung dieser Hypothesen dar. Besonders die Entdeckung einer möglichen FNR-Bindestelle und daher einer Steuerung der *Eca3984* Expression befürwortet die Herstellung und Charakterisierung einer FNR-Mutante. Nach der Herstellung eines entsprechenden „K.O.“-Konstruktes (pCU38.1), wurden zur Ermittlung von Abfolge und Orientierung der entsprechenden DNA-Bereiche wiederum auf PCR-Analysen zurückgegriffen (Abb. 58). Hierbei wurde eine Unterbrechung der *Eca2207* Gen-Sequenz mittels einer Gen-spezifischen Primerkombination (fnrs/fnras) gezeigt, die ein klar verlängertes Produkt, durch Insertion der Kanamycin-Kassette, gegenüber der Wildtypsequenz hervorbrachte (Abb. 58). Das dabei entstandene Produkt von ca. 2000 Basenpaaren entsprach ebenfalls der erwarteten Größe (Vergleiche Abb. 59). Auch der Resistenzmarker selbst, konnte mittels Resistenz-spezifischen Primern (Ks/Kas) nachgewiesen werden.

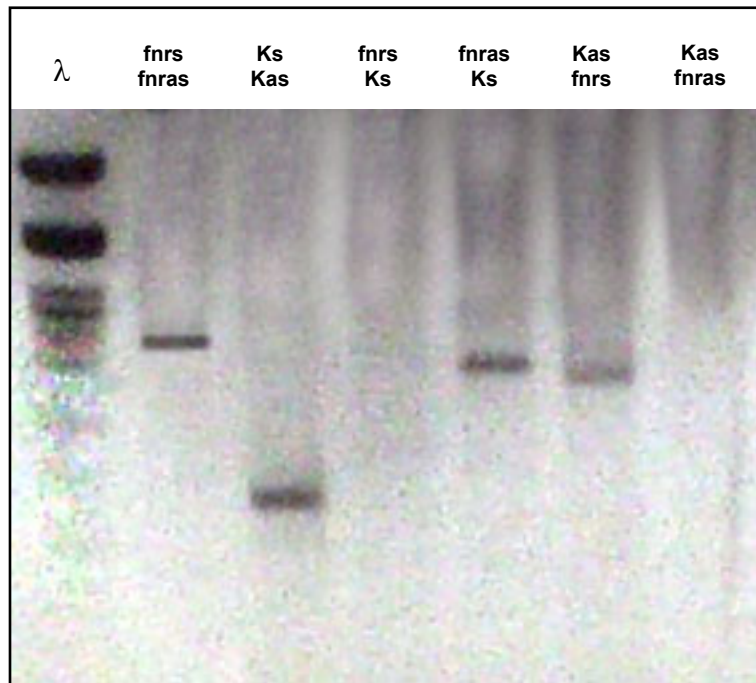


Abb. 58: PCR-Analyse des *Eca2207* (*fnr*) „K.O.“-Konstruktes. Gezeigt ist ein Agarosegel auf dem PCR-Reaktionsansätze aufgetragen und aufgetrennt wurden. Die verschiedenen Ansätze beinhalten unterschiedliche Primer-Paare. Die Primer-Paarungen sind jeweils oberhalb der Laufspuren vermerkt. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt. Als Template wurde das als pCU38.1 bezeichnete Plasmid benutzt. Als Marker (λ) wurde PstI geschnittene λDNA verwendet (Fermentas, St. Leon Rot)

Die Orientierung der Resistenz-Kassette und die Abfolge der entsprechenden DNA-Bereiche konnte auch durch PCR-Analysen festgestellt werden. Zwei Primer-Paarungen eines Gen- und eines Resistenz-spezifischen Primers (fnrs/Kas; fnras/Ks) erlaubten die Amplifikation charakteristischer Produkte mittels denen die für dieses Konstrukt vorliegende Orientierung der enthaltenen DNA-Sequenzen ermittelt wurde. Mittels der zwei anderen Kombinationen konnte kein Produkt amplifiziert werden. Generell entsprach die Größe der jeweiligen Fragmente die aus den PCR-Analysen hervorgingen den erwarteten Größen. Hieraus wurde das in Abb. 59 gezeigte Schema abgeleitet, welches als Orientierung zur Überprüfung von putativen Insertionsmutanten dienen sollte. Als Kontrolle wurden die bei der PCR erzeugten Amplifikate mittels Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

Die Transformation von kompetenten *Eca* Zellen mit dem oben beschriebenen Konstrukt (pCU38.1), führte zur Isolierung von vier putativen „K.O.“-Mutanten. Nach Selektion auf Ampicillin und Kanamycin konnte nur eine dieser vier als Insertionsmutanten, welche aus einem „double crossing-over“ hervorgegangen sind, identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Transformante zeigte als einzige ein Wachstum auf Kanamycin jedoch nicht auf Ampicillin. Mittels des Orientierungsschemas (Abb. 59) konnte wiederum ein charakteristisches Produkt-Muster zur Bestätigung einer Insertion und einer erfolgreichen Mutagenese abgeleitet werden. Die untersuchte putative Mutante zeigte hierbei, das erwartete Produkt-Muster. Demnach konnte auch bei PCR-Analysen an dieser Mutante mittels genspezifischer Primer (fnrs/fnras) eine Insertion der Resistenz-Kassette und somit

nachweisbar. Auch die Kanamycin-Resistenz war bei Reaktionen mit *Eca2207::kan^R* Mutante-Zellen amplifizierbar. Ein Produkt mit diesen Primern blieb bei Reaktionen mit Wildtyp-Zellen wie erwartet aus. Des Weiteren lieferten auch die Gen/Resistenz spezifischen Primerkombinationen beim Wildtypen keine Produkte, führten jedoch bei der *Eca2207* Insertionsmutante zum Nachweis der charakteristischen Produkte. Demnach kann von einer erfolgreichen Mutagenese für den *Eca2207* Locus ausgegangen werden.

Auch hier konnte bisher aus Zeitgründen noch keine PCR-Analyse zur Überprüfung der räumlichen Lokalisierung nach Rekombination durchgeführt werden.

3.3.4.2 Biochemische Charakterisierung

Da bei *E.coli fnr*-Mutanten bereits beschrieben sind, konnte auf diese Phänotypisierung zur biochemischen Charakterisierung der hier erzeugten *Erwinia* Mutante zurückgegriffen werden.

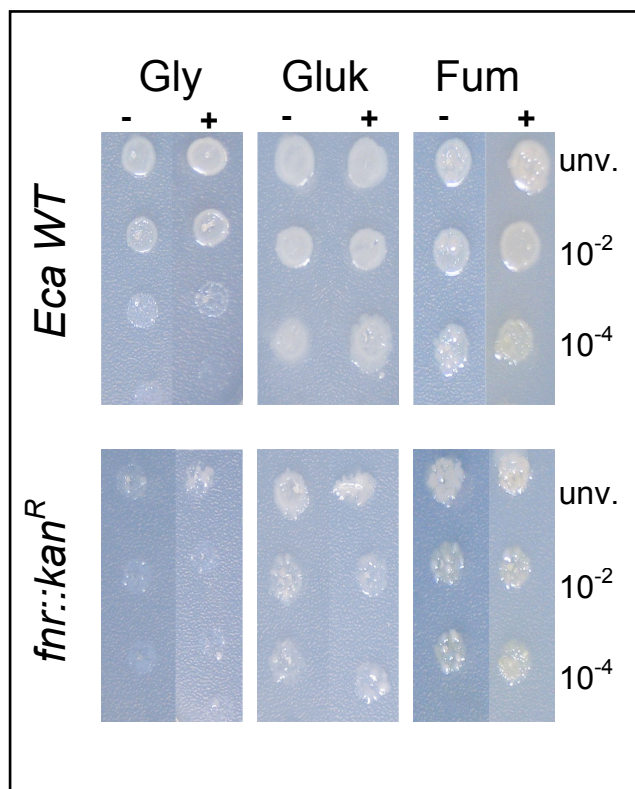


Abb. 62: Anzucht zur Charakterisierung der *fnr::kan^R* Mutante unter aeroben Bedingungen.

Gezeigt sind jeweils das Wachstum einer Bakteriensuspension auf M9-Minimalmediumplatten mit den angegebenen Kohlenstoffquellen (Glycerin 50mM; Glukose 10mM; Fumarat 50mM). Bei den mit (+) vermerkten Reihen wurde NaNO_3 in einer Endkonzentration von 50mM eingesetzt. Bei den mit (-) vermerkten Reihen erfolgte keine Zugabe von NaNO_3 . Die Verdünnungsreihen wurden jeweils aus einer Ausgangssuspension der entsprechenden Bakterien mit einer $\text{OD}_{600} = 1$ angefertigt. Jeweils 4 μl der jeweiligen Verdünnungen wurden auf die entsprechenden Platten aufgetropft. Die Auswertung erfolgte visuell nach Inkubation für 24h bei 30°C.

So zeichnet sich eine *fnr*-Mutante dadurch aus, dass sie nicht mehr oder nur sehr stark eingeschränkt anaerob auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle wie Glycerin oder Laktat oder in Gegenwart der meisten alternativen Elektronenakzeptoren wachsen kann (Constantinidiou *et al.*, 2005). In den durchgeführten Wachstumstest wurde als terminaler Elektronenakzeptor Nitrat verwendet. Des Weiteren wurden als Kohlenstoffquellen Glycerin,

Glukose und Fumarat benutzt. Wie Abb. 62 zeigt, konnte unter aeroben Bedingungen kein Unterschied im Wachstum auf Glukose oder Fumarat festgestellt werden. Wurde jedoch die nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle Glycerin angeboten, zeigte die *fnr* Insertionsmutante ein gehemmtes Wachstum gegenüber dem *Erwinia* Wildtypen. Dieser wuchs zwar etwas schlechter als auf den weiteren angebotenen Kohlenstoffquellen, bildete jedoch bis zur 10^{-4} Verdünnung klar erkennbare Kolonien (Abb. 62).

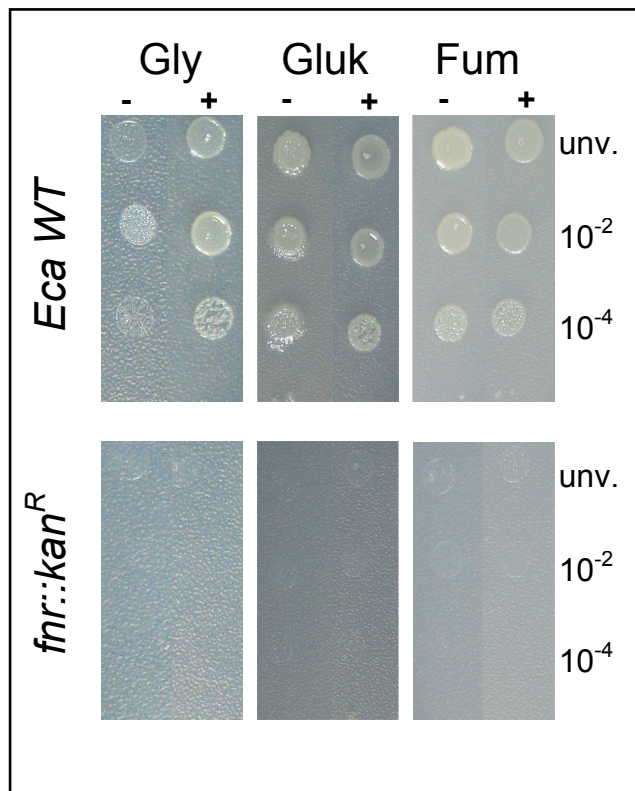


Abb. 63: Anzucht zur Charakterisierung der *fnr::kan^R* Mutante unter anaeroben Bedingungen. Gezeigt sind jeweils das Wachstum einer Bakteriensuspension auf M9-Minimalmediumplatten mit den angegebenen Kohlenstoffquellen (Glycerin 50mM; Glukose 10mM; Fumarat 50mM). Bei den mit (+) vermerkten Reihen wurde NaNO_3 in einer Endkonzentration von 50mM eingesetzt. Bei den mit (-) vermerkten Reihen erfolgte keine Zugabe von NaNO_3 . Die Verdünnungsreihen wurden jeweils aus einer Ausgangssuspension der entsprechenden Bakterien mit einer $\text{OD}_{600} = 1$ angefertigt. Jeweils 4µl der jeweiligen Verdünnungen wurden auf die entsprechenden Platten aufgetropft. Die Auswertung erfolgte visuell nach Inkubation für 24h bei 30°C unter anaeroben Bedingungen mittels des Anaerocult Systems (Merck, Darmstadt).

Unter anaeroben Bedingungen zeigte sich ein anderes Bild. Hier war die *fnr::kan^R* Mutante nicht mehr in der Lage auf den angebotenen Kohlenstoffquellen in Gegenwart oder Abwesenheit eines Elektronen Akzeptors zu wachsen (Abb. 63). Der *Erwinia* Wildtyp-Stamm bildete dagegen über alle Verdünnungsreihen hinweg auf den angebotenen Kohlenstoffquellen Kolonien. Bei Glukose und Fumarat, konnte zwischen Zugabe und Abwesenheit von Nitrat kein signifikanter Wachstumsunterschied festgestellt werden. Wurde jedoch Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle im Medium angeboten, war ein signifikant besseres Wachstum in Gegenwart des Endakzeptors Nitrat zu beobachten.

Um zu zeigen, dass die Citratverwertung möglicherweise unter der Kontrolle des FNR-Proteins steht, welches durch Wechselwirkungen mit Promotorelementen die Expression von entsprechenden Genen steuert, wurden anaerobe Anzuchtversuche auf SCM-Medium durchgeführt.

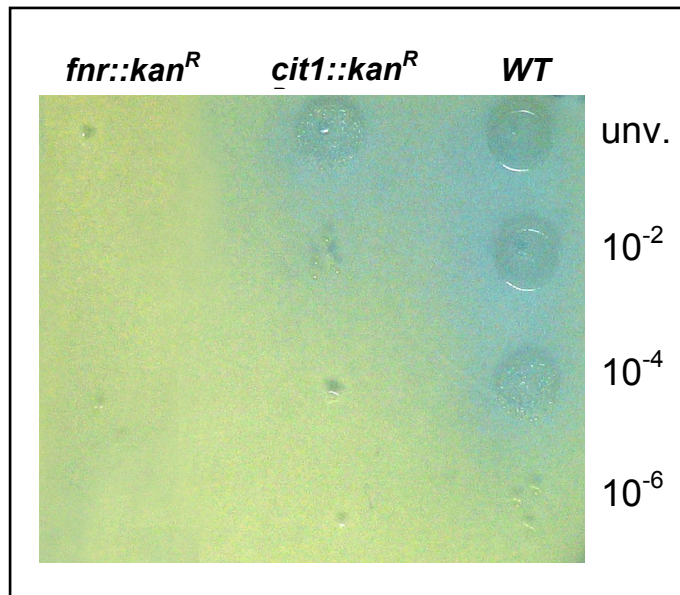


Abb. 64: Anaerober Wachstumstest auf Simmons Citrat Medium (SCM). Gezeigt ist ein Wachstumstest mittels Verdünnungsreihen auf SCM. Nach Anfertigung sukzessiver Verdünnungen für Bakteriensuspensionen einer $OD_{600} = 1$ von *Eca* Wildtyp (WT) *cit1* Mutantenzellen (*cit1::kan^R*) als auch *fnr* Mutantenzellen (*fnr::kan^R*) wurden jeweils 4 μ l der rechts angegebenen Verdünnungsreihen auf eine SCM-Agarplatte aufgetropft. Die Auswertung erfolgte visuell nach einer 48 stündigen Inkubation bei 30°C mit Hilfe des Anaerocult-Systemes (Merck, Darmstadt).

Wie in Abb. 64 zu sehen ist, konnte für den Wildtypen eine positive Citrat-Verwertung festgestellt werden (Abb. 30). Dieser bildete bis zur 10^{-6} Verdünnung Kolonien und zeigte damit ein Wachstum verbunden mit der charakteristischen Blaufärbung des Citrat-Mediums. Die *cit1::kan^R* Mutante zeigte ein stark eingeschränktes Wachstum und vermochte nur als unverdünnte Bakteriensuspension einige Kolonien zu bilden. Die *fnr::kan^R* Mutante zeigte in diesen Versuchen keinerlei Wachstum auf SCM-Medium (Abb. 64). Bei keiner der aufgetropften Bakterienspots konnten Kolonien oder eine Färbung des Agars beobachtet werden. Demnach scheint eine *Erwinia fnr* Insertionsmutante nicht in der Lage zu sein auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle unter den hier beschriebenen Bedingungen zu wachsen.

3.3.4.3 Phytopathologische Charakterisierung

Nach der biochemischen Charakterisierung der *fnr*-Mutante war eine Untersuchung der Virulenz mittels Kartoffelscheibchentests bezüglich der Gewebemazeration im Vergleich zum *Erwinia* Wildtypen von entscheidender Bedeutung. Hierbei wurde beobachtet, dass die *Eca2207* Insertionsmutante eine signifikant schwächere Mazeration von Knollengewebe aufweist als der Wildtyp. So konnte in entsprechenden Versuchen festgestellt werden, dass bei Inokulation mit *fnr* „K.O.“-Mutanten nahezu kein Gewebe angegriffen wird. Eine Pathogenese, die sich in einer sichtbaren und messbaren Gewebemazeration verdeutlicht, wurde durch die *Eca2207::kan^R* Mutante nur sehr schwer erreicht. So blieben in Knollenscheibchenexperimenten nach Mazeration durch Wildtyp-Zellen $51 \pm 5,9$ Prozent intaktes Gewebe zurück. Bei Knollen welche mit *fnr::kan^R* Zellen inokuliert wurden, konnte dagegen bis zu $88 \pm 5,8$ Prozent an intaktem Gewebe gemessen werden. Dementsprechend bleibt festzuhalten, dass eine *Erwinia* Mutante mit einem nicht funktionellen *fnr*-Gen nicht nur

einen dramatischen Wachstumsunterschied unter anaeroben Bedingungen zeigt, sondern auch bei aerob durchgeführten Kartoffelknollen-Experimenten in ihrer Virulenz stark beeinträchtigt ist.

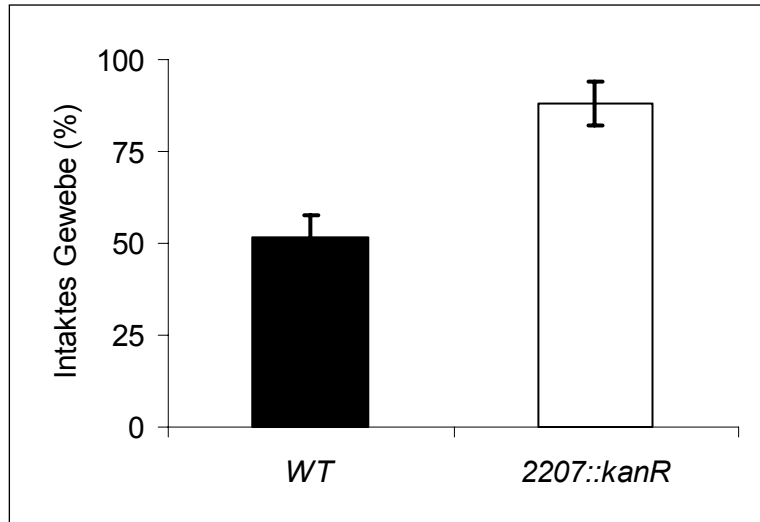


Abb. 65: Quantifizierung des durch Erwinien mazerierten Gewebes mittels Knollenscheibchentests. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen mit den zugehörigen Standardabweichungen. Der bei den Versuchen verwendete Bakterienstamm ist jeweils unter dem entsprechenden Balken vermerkt. Versuche wurden aerob wie in Kap. 2.3.1 beschrieben durchgeführt.

3.4 Biochemische Charakterisierung von Transportproteinen aus *Magnaporthe grisea*

In den vorangegangenen Kapiteln die sich mit *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* beschäftigt haben, konnte gezeigt werden, dass Transportproteine durchaus von Bedeutung bei einer erfolgreichen Pathogenese des entsprechenden Erregers sein können. In Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. T. Becker (AG Thines, IBWF) sollte nun die Bedeutung ausgewählter Transportproteine für die Virulenz von *M.grisea* untersucht werden. Hierzu wurde eine molekulare sowie phytopathologische Charakterisierung durch Dipl. Biol. T. Becker (AG Thines) vorgenommen und um eine biochemische Analyse ergänzt (Diese Arbeit).

So konnte für einen putativen Glycerin/H⁺ Symporter die nötigen Vorbereitungen einer biochemischen Analyse im heterologen Hefesystem durch die Herstellung entsprechende DNA-Konstrukte und einer Glycerin-Transporter defizienten Hefe-Mutante (Carlsberg Laboratory; Denmark) getroffen werden.

Für ein weiteres Protein konnte eine Komplementationsstudie an einer weiteren Hefemutante abgeschlossen werden. Bei dieser Hefemutante handelt es sich um den in der Literatur (Fischer *et. al.*, 2001) beschriebenen 22Δ8AA Stamm. Dieser Stamm zeichnet sich durch die multiple Deletion von Aminosäure-Transportern aus. Demnach sind Hefezellen dieses Stammes nicht mehr fähig Arginin, Aspartat, Citrullin, GABA, Glutamat, Histidin, Lysin und Prolin als einzige Stickstoffquelle bei gleichzeitiger Abwesenheit von NH₄Cl zu benutzen. Durch Einbringen eines Genes (*rig2*), welches für eine putative Aminosäurepermease kodiert,

in einen geeigneten Expressionsvektor kann nun auf Komplementation der oben beschriebenen Defizienz überprüft werden.

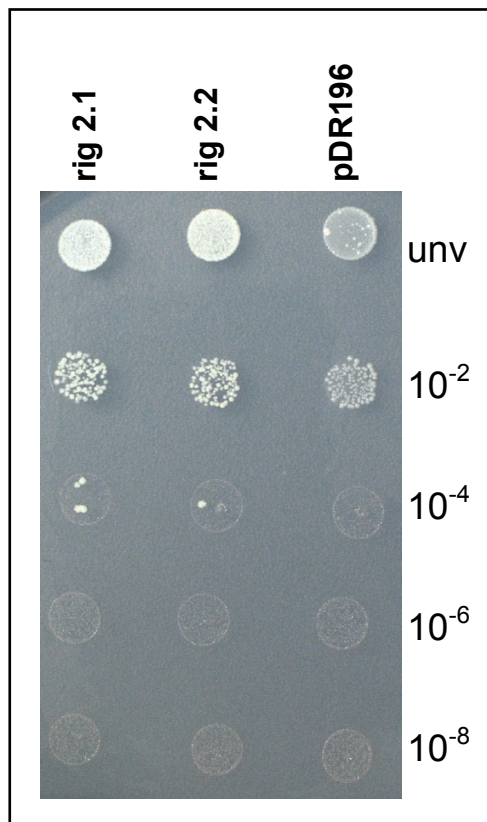


Abb. 66: Wachstumstest auf Hefe-Minimalmedium. Gezeigt ist ein Wachstumstest auf Hefe Minimalmediumplatten mit Yeast Nitrogen Base (YNB) ohne Aminosäuren und Ammoniumchlorid (YNB –AA; -NH₄Cl). Prolin wurde in einer Endkonzentration von 1,5mM eingesetzt. Nach Anfertigung sukzessiver Verdünnungsreihen für Hefekulturen einer OD₆₀₀ = 1 von pCUY_rig2 tragenden Transformandenzellen (rig2.1; rig2.2) und pDR196 Vektor beinhaltenden 22Δ8AA Hefe-Zellen, wurden jeweils 4μl der rechts angegebenen Verdünnungsreihen auf die entsprechenden Agarplatten aufgetropft. Die Auswertung erfolgte visuell nach einer 48stündigen Inkubation bei 30°C.

Hierzu wurden zwei Transformanden sowie 22Δ8AA Mutanten-Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor pDR196 transformiert wurden, auf Benutzung und folglich Wachstum auf den oben erwähnten Stickstoffquellen getestet. Hierbei konnte nur bei Prolin eine erfolgreiche Komplementation festgestellt werden. Bei den restlichen getesteten Stickstoffquellen wurde dagegen kein besseres Wachstum der Transformanden gegenüber den mit leerem Vektor transformierten Zellen beobachtet.

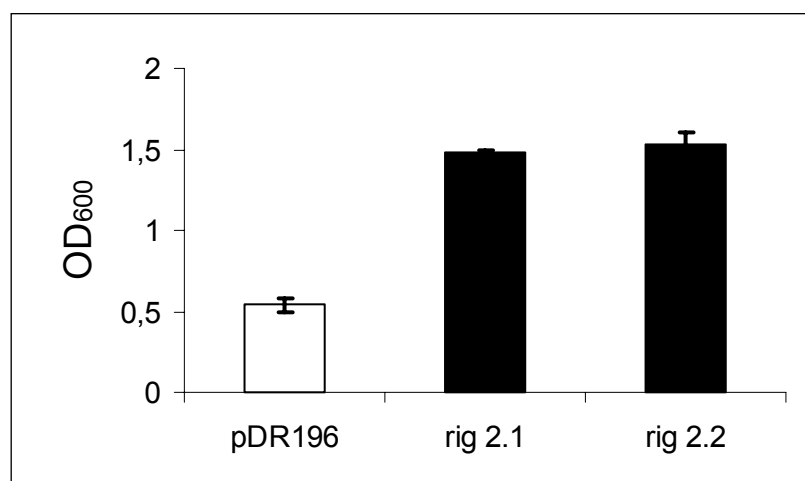


Abb. 67: Wachstumstest mittels Hefe Minimalmedium (YNB –AA; -NH₄Cl) in Flüssigkultur (EK., Prolin 1,5mM). Gezeigt sind OD₆₀₀ Werte der angegebenen Hefekulturen. Die Auswertung erfolgte nach 48stündiger Inkubation bei 30°C. Angegeben sind Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche mit jeweiligen Standardabweichungen.

Wie Abb. 66 zeigt, konnte bei Zugabe von 1,5mM Prolin als einziger Stickstoffquelle, ein Wachstum der Mutanten bis zur 10^{-4} Verdünnung festgestellt werden. Zellen mit leerem Vektor zeigten dagegen nur ein unspezifisches Rest-Wachstum mit Kolonien deren Zellen bereits am Absterben waren.

Um ein Wachstum der komplementierten Hefe-Mutanten auf Prolin als einziger Stickstoffquelle nochmals genauer auszuarbeiten, wurden Anzuchtversuche in Flüssigmedium durchgeführt. Auch hier zeigten nur die Transformanden mit der *rig2* Gensequenz ein Wachstum. Zellen mit leerem Vektor konnten zwar nach 48stündiger Inkubation eine geringe Zunahme der OD₆₀₀ verzeichnen, blieben aber deutlich unter den Werten, die durch die beiden getesteten Transformanden erreicht wurden. Wie Abb. 67 zu entnehmen ist, erreichten nach 48 Stunden die als *rig2.1* und *rig2.2* bezeichneten Transformanden OD₆₀₀ Werte von um die 1,5. Zellen der 22Δ8AA Mutante, die mit leerem pDR196-Vektor transformiert worden waren, zeigten dagegen ein sehr geringes Wachstum und erreichten OD₆₀₀ Werte die bei ca. 0,4 lagen (Abb. 67).

4 Diskussion

Die bisherigen Untersuchungen an NTT-antisense Kartoffelknollen zeigten, dass diese sich sowohl durch einen erhöhten Gehalt an reduzierenden Zuckern als auch drastisch erniedrigte Stärkegehalte kennzeichnen (Tjaden *et al.*, 1998; Geigenberger *et al.*, 2001). Weiterhin zeigten Versuche hinsichtlich der Pathogenresistenz solcher Knollen, dass eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Vielzahl an Phytopathogenen vorliegt. So wurde durch vorangegangene Analysen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen den bakteriellen Erreger der Knollennassfäule *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* und den pilzlichen Erreger der Dürrfleckenkrankheit *Alternaria solani* festgestellt (Linke *et al.*, 2002; Conrath *et al.*, 2003). Kürzlich durchgeführte Versuche erweiterten das Spektrum der oben erwähnten Widerstandsfähigkeit um Nematoden und Kartoffelmosaikvirus Y (Reinhold, Daten nicht publiziert). Die beschriebene Breitbandresistenz kann auf eine Potenzierung verschiedenster pflanzlicher Abwehrmechanismen zurückgeführt werden. So ist eine solche Potenzierung des frühen „Oxidative-Burst“ bei Befall von NTT-antisense Knollengewebe durch Pathogene, eine stärkere Akkumulation von Abwehrrelevanten Transkripten, als auch eine erhöhte Konzentration an Alkaloiden in NTT-antisense Knollengewebe feststellbar (Linke, 2003). Diese Veränderungen alleine erklären jedoch nicht die vorhandene Resistenz dieser Knollen (Linke, 2003). Vielmehr befinden sich die transgenen Kartoffelpflanzen in einem Alarmzustand, der eine sehr rasche und starke Antwort auf Pathogene hervorruft. Ein solches Phänomen wird gemeinhin als „Priming“ bezeichnet (Conrath und Kauss, 2000). Dementsprechend ist es also ein bisher noch nicht identifiziertes mobiles Signal, das sich systemisch in der Kartoffelpflanze verbreiten kann und welches der erhöhten Resistenz von hetero- und autotrophen NTT-antisense Geweben zu Grunde liegt (Linke, 2003).

Da wie bereits unter Kap. 1.7 beschrieben, direkte genetische Untersuchungen an Kartoffelpflanzen nur sehr schwierig durchzuführen sind, sollte auf den bereits oben bekannten Ergebnissen bezüglich der Resistenz von NTT-antisense Knollengewebe gegenüber *Eca* aufgebaut werden. Da durch die kürzlich abgeschlossene Genomsequenzierung (Bell *et al.*, 2004) von *Eca* molekulare Informationen zur gezielten Veränderung der bakteriellen Physiologie verfügbar sind, sollten diese genutzt werden um durch Mutantenstudien weitere Erkenntnisse zu erlangen. Hierbei sollten ausgewählte Gene welche für Transportproteine kodieren ausgeschaltet und die Auswirkungen auf den bakteriellen Stoffwechsel und vor allem die Pathogenese von *Eca* auf Kartoffelknollengewebe überprüft werden. Weiterhin sollten diese Ergebnisse betreffend dem Verhalten von Pathogen und Wirt, bezüglich des mobilen systemischen „Priming“-Signals und der Resistenz von NTT-antisense Knollen interpretiert werden. Dadurch sollten mögliche Hinweise zur Identifizierung des bisher unbekannten Signals gesammelt werden. Dies würde

neue richtungsweisende Experimente ermöglichen, welche der Aufklärung der erhöhten Breitband-Resistenz dienen.

4.1 Ziele einer „K.O.“-Mutagenese

Durch das Genomprojekt *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* ist nun bekannt, dass dieses phytopathogene Bakterium ein einziges zirkuläres Chromosom (5,06Mbps) besitzt, einen GC-Gehalt von 51% und ungefähr 4491 kodierende Sequenzen aufweist (Bell *et al.*, 2004). Ungefähr 33 % dieser Sequenzen konnten bisher unter den Enterobacteriaceae nur bei *Eca* nachgewiesen werden. Ein Großteil dieser kann wiederum dem Transport, Energie-Metabolismus und verschiedenen Regulatoren zugeordnet werden (Bell *et al.*, 2004). Neuere Studien bezüglich der differentiellen Expression verschiedenster Sequenzen bei Befall von Pflanzengewebe durch Erwinien zeigten, dass die Anzahl an Transkripten die der Klasse der Typ III Virulenzfaktoren zuzuordnen sind, jene der Klassen I und II deutlich übersteigt (Okinaka *et al.*, 2002). Die Klasse III Virulenzfaktoren, zu der neben Genen zur Verteidigung oder zum Strukturerhalt auch spezifische Transporter, Sensoren und Systeme zum Schutz vor oxidativem Stress gehören, unterscheiden sich von solchen der Klasse I, die dem Wirt direkten Schaden zufügen und jenen der Klasse II, die Regulatoren der Klasse I Gene beinhalten (Wassenaar & Gastra, 2001). Hierdurch sind sie in der Vergangenheit bei Virulenzanalysen oft vernachlässigt worden. Neuere Untersuchungen sprechen diesen Genen jedoch eine wichtige Bedeutung hinsichtlich der Pathogenese zu. So konnte gezeigt werden, dass bei Befall von Birnengewebe durch *Erwinia amylovora* die Anzahl an Transkripten welche Transport und Stoffwechsel zugeordnet werden können (13,5 %, respektiv 20,3 %) jene anderer Klassen deutlich überschreitet (Zhao *et al.*, 2005). Andere Studien zeigten wiederum, dass sehr viele induzierte Gene dem anaeroben Stoffwechsel und den damit verbundenen Regulationen und Veränderungen der bakteriellen Physiologie angehören (Okinaka *et al.*, 2002). Diese Analysen und die bereits gesammelten Daten hinsichtlich Metaboliten-Zusammensetzung sowie deren Unterschiede zwischen Wildtyp und NTT-antisense Kartoffelknollen (Tjaden *et al.*, 1998; Geigenberger *et al.*, 2001; Linke, 2003) erlaubten eine Auswahl geeigneter Sequenzen zur Durchführung einer „K.O.“-Mutagenese.

4.1.1 Ein neues System zur Erzeugung von *Eca* Mutanten

Um die weiter oben erwähnten Mutantenstudien durchzuführen, mussten neben Zielgenen einer „K.O.“-Mutagenese auch ein entsprechendes System zur Herstellung von *Eca*-Mutanten bereitgestellt werden. Hierzu wurde das unter 2.1.5.11 beschriebene System

benutzt. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit hergestellt und ist speziell auf die Erfordernisse einer „K.O.“-Mutagenese bei *Eca* angepasst.

Da in dieser Arbeit eine gezielte Mutagenese von Kandidaten-Genen durchgeführt werden sollte, konnten Systeme zur Erzeugung von Transposon-Mutanten („random“-Mutagenese) nicht benutzt werden (Geider *et al.*, 1985; Geider & Baldes, 1988; Metzger *et al.*, 1992). Demnach musste auf einen so genannten „Suicide-vector“ und die homologe Rekombination zurückgegriffen werden. Der in Kapitel 2.1.5.11 vorgestellte und in dieser Arbeit generierte „Suicide-Vektor“ beruht auf einem im Laborgebrauch weit verbreiteten Klonierungsvektor pUC18. Im Gegensatz zu den bestehenden Systemen die durch inkompatible Replikationsursprünge im Zielorganismus nicht mehr replizieren können, ist pUC18 und somit auch der während dieser Arbeit generierte „Suicide-Vektor“ (pEco) zur Replikation in *Eca* befähigt. Zur eigentlichen „K.O.“-Mutagenese muss also durch einen Enzymverdau mittels dem Restriktionsenzym *EcoRI* der bestehende Replikationsursprung eliminiert werden. Diese Restriktion und die anschließende Religation die benötigt wird um eine hohe Transformationseffizienz zu erreichen, sind zusätzliche Schritte die bei den gebräuchlichen „K.O.“-Systemen entfallen. Dennoch ist das hier benutzte System eine durchaus effiziente und zuverlässige Alternative zu den bereits bestehenden „Suicide-Vektoren“. So konnten wie im Ergebnisteil und im Anhang dieser Arbeit gezeigt mehrere Zielsequenzen bei *Eca* unterbrochen werden (Kap. 3.1; 3.2; 3.3). Die so erzeugten Mutanten wurden nach einer ausführlichen molekularen und in einzelnen Fällen auch biochemischen Charakterisierung als solche bestätigt (Kap. 3.2). Demnach konnte ein erstes und wichtiges Ziel der hier vorliegenden Arbeit erreicht werden, welches die Herstellung des unter 2.1.5.11 beschriebenen Systems zur Generierung von *Eca* „K.O.“-Mutanten vorsah.

4.2 *Eca*-Mutanten zum Prolintransport

Durch die vorangegangenen Selektionskriterien bezüglich möglicher Ziele einer Mutagenese an *Eca* wurde versucht Prolin-Transportsysteme auszuschalten. So ist Prolin nicht nur bei der Symbiose sondern auch bei der Verteidigung von Pflanzen gegen Mikroorganismen von großer Bedeutung (Vilchez *et al.*, 2000; Fabro *et al.*, 2004; Gloux *et al.*, 2005). Weiterhin konnte durch „MicroArray“ Analysen gezeigt werden, dass Transkripte von Transportsystemen zur Prolin-Aufnahme und eng verwandte Prolin-transportierenden Osmoprotektantensystemen bei Befall von Chrysanthemen durch *Erwinia chrysanthemi* spezifisch akkumulieren (Okinaka *et al.*, 2002). Auch die Prolingehalte von Wildtyp und NTT-antisense Kartoffelknollengewebe weisen deutliche Unterschiede auf (Mitteilung Dr. Geigenberger, MPI Golm). Demnach entsprechen solche DNA-Sequenzen den unter 4.1 vorgestellten Kriterien eines Ziels zur „K.O.“-Mutagenese.

Der Genlokus *Eca4218* sollte als erstes Ziel einer „solchen Mutagenese unterbrochen werden. Nach BLAST-Analysen (www.ncbi.nlm.nih.gov; www.expasy.org) werden als nächste Homologe dieses Genlokus Sequenzen angegeben, die für Natrium gekoppelte Prolin-Aufnahmesysteme kodieren (Daten nicht gezeigt). Die als PutP oder auch PP-1 bezeichneten Produkte dieser Gensequenzen sind zumindest für einige Humanpathogene bereits biochemisch charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Proteinen um hoch affine Prolin-Transporter handelt, die durch einen Natriumgradienten angetrieben werden (Spiegelhalter & Bremer, 1998; Townsend & Wilkinson, 1992; von Blohn *et al.*, 1997; Wengender & Miller, 1995). Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden dass das PutP Protein eine große Rolle bei der Kolonialisierung von menschlichem Gewebe durch das pathogene gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* spielt (Schwan *et al.*, 2006).

Wie unter Kap. 3.1.1.1 beschrieben gelang es mehrere *Eca4218* „K.O.“-Mutanten zu generieren. Diese Mutanten konnten weiterhin durch eine gründliche molekulare Charakterisierung in ihrer *putP*-Defizienz bestätigt werden. Eine erfolgreiche „K.O.“-Mutagenese durch eine Integration nach homologer Rekombination am entsprechenden *Eca4218* Lokus konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 10). Demnach konnte erstmals eine erfolgreiche „K.O.“-Mutagenese durch das unter 2.1.5.11 vorgestellte Vektorsystem (pEco) erreicht und nachgewiesen werden. Die Defizienz in einer funktionellen *Eca4218* Sequenz konnte auch durch eine „Northern-Blot“ Analyse unterstützt werden, bei der kein Transkript des entsprechenden Genes bei der Insertionsmutante nachgewiesen werden konnte (Abb. 11).

Bei dem Versuch eine biochemische Analyse der Transporteigenschaften des ECA4218 Proteins durchzuführen konnte eine solche Charakterisierung jedoch nicht erreicht werden. So konnten weder im heterologen *E.coli*-System noch an intakten Erwinien Zellen Transportraten ermittelt werden, die direkt diesem Transportsystem zugeschrieben werden können. Da die oben erwähnten Sequenzanalysen der Aminosäureabfolge des ECA4218 Proteins mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Funktion analog der beschriebenen PutP-Homologe hindeuten, sollte ein durch das ECA4218 katalysierter Prolin-Transport nachweisbar sein. Trotz der fehlenden biochemischen Daten kann eine solche Funktion aufgrund einer fehlenden Expression nicht ausgeschlossen werden. Für das Ausbleiben einer solchen gibt es mehrere Erklärungen. Zumindest eine abweichende „codon-usage“ kann als möglicher Grund ausgeschlossen werden, da diese mit der *E.coli* eigenen absolut identisch ist. Vor allem bei Membranproteinen kann jedoch eine erschwerte Untersuchung eines Proteins im heterologen *E.coli*-System auf eine sehr starke initiale Proteinsynthese zurückgeführt werden. Diese strapaziert die zur Expression verwendeten Zellen so sehr, dass ein Wachstumsabbruch stattfindet der mit einem Absterben der entsprechenden Bakterien einhergeht (Haferkamp, Daten nicht publiziert; Frühwald, 2006).

Eine solches Phänomen ist vor Allem bei Proteinen bakteriellen Ursprungs beobachtet worden (Haferkamp, Daten nicht publiziert). Um dieses Phänomen zu umgehen, müsste auf veränderte *E.coli* Bakterienstämme (*E.coli* Tuner(DE3)pLacI; Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt) zurückgegriffen werden, die eine genaue Kontrolle der Proteinsynthese zulassen.

Wie unter 3.1.1.2 beschrieben, erbrachten auch Transportversuche an intakten *Erwinia* Zellen keine ausreichenden Informationen bezüglich der Biochemie des ECA4218 Proteins. So unterschieden sich die Aufnahmeraten von *Erwinia* Wildtyp und *Eca4218::kan^R* Zellen kaum. Die festgestellten Aufnahmeraten waren zwar zeitabhängig, lagen aber hinsichtlich ihrer maximalen Aufnahmen weit unter jenen, die für bereits charakterisierte Homologe ermittelt wurden. Da weitere Systeme zur Prolinaufnahme bei Enterobakterien beschrieben sind und eine weitere Optimierung des experimentellen Versuchsaufbaus notwendig wäre um biochemische Daten zu sammeln, wurde versucht durch phytopathologische Untersuchungen weitere Anhaltspunkte zu sammeln. Diese sollten rasch weitere Informationen über die Bedeutung des ECA4218 Proteins für die Virulenz und die mögliche biologische Funktion erbringen.

Hierbei zeigten sowohl Untersuchungen der pektolytischen Aktivität auf PEC-Platten als auch Kartoffelknollentests, dass ein funktioneller *Eca4218* Locus für die Pathogenese von *Erwinia* auf Kartoffelgewebe nicht notwendig ist. Bei diesen Tests waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten Zellen feststellbar (Abb.12; Abb. 13). Des Weiteren zeigten Infiltrationsversuche mit Prolin, dass eine erhöhte apoplastische Prolinkonzentration eine Verringerung des mazerierten Kartoffelgewebes bewirkt (Abb. 14). Wurde bei solchen Versuchen jedoch mit Konzentrationen über 10mM Prolin gearbeitet so glichen sich die leichten Unterschiede zwischen Wildtyp und *4218::kan^R* Zellen an und waren schließlich bei einer Konzentration von 25mM Prolin vernachlässigbar. Interessanterweise konnte jedoch bei einer Infiltration mit 1mM ein größerer Unterschied in der Mazeration von Knollengewebe zwischen den beschriebenen Stämmen festgestellt werden (Abb. 14). Physiologische Konzentrationen von Prolin in Kartoffelknollengewebe liegen ungefähr bei 2mM. Demnach könnte unter solchen Bedingungen ein funktionelles ECA4218 Protein von Bedeutung sein. So wird Prolin von Bakterien-Zellen nicht nur als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle benutzt, sondern auch als Osmotikum verwendet (Choquet *et al.*, 2005). Da die bisherigen Daten lediglich Spekulationen über eine Funktion des entsprechenden Proteins und dessen Bedeutung beim Befall von Kartoffelknollen durch *Erwinia* zuließen, wurde im Besonderen hinsichtlich der Existenz weiterer Systeme dazu übergegangen auch diese weiter zu charakterisieren.

Als weiteres Ziel einer Mutagenese wurde der *Eca3503* Locus gewählt. Das Genprodukt dieser Sequenz, ist als Homolog zu dem ProU System zur Aufnahme von osmotisch aktiven Substanzen wie Prolin, Glycin-Betain aber auch Cholin in

computergestützten Datenbanken aufgeführt (www.expasy.org). Auch für diese Sequenz konnte wiederum eine erfolgreiche Mutagenese durchgeführt werden. So konnte mittels verschiedener „Screeningverfahren“ (Kap. 2.1.5.11) durch PCR-Studien die Unterbrechung und Insertion im *Eca*-Genom bestätigt werden.

Der Versuch einer biochemischen Charakterisierung des korrespondierenden ECA3503 Proteins erfolgte an intakten Erwinien-Zellen. Jedoch traten auch hier die bereits oben geschilderten Probleme auf. So konnte aus den ermittelten Aufnahmeraten kein Transport des ECA3503 Proteins abgeleitet werden. Da diese Probleme bereits bei der Charakterisierung des ECA4218 Proteins auftraten, muss in Betracht gezogen werden, dass die bisherige Versuchsdurchführung den Nachweis eines Prolintransportes nicht zulässt. Hierbei wäre es durchaus vorstellbar, dass unter den gegebenen Anzuchtbedingungen eine Expression der untersuchten Proteine in *Eca* nicht stattfindet, was die sehr geringen Transportraten erklären würde. Hierbei würde es sich nämlich um Hintergrundaktivität handeln, die auf zeitabhängiges „Kleben“ zurückzuführen wäre. Der zeitliche Rahmen dieser Arbeit ließ weiterführende Analysen zur Ermittlung von biochemischen Eigenschaften der hier untersuchten Prolin-Aufnahmesysteme durch Verbesserungen des experimentellen Designs leider nicht zu, so dass auf eine Charakterisierung verzichtet wurde.

Dennoch wurden auch mit der *Eca3503::kan^R* Mutante phytopathologische Versuche durchgeführt. Hierbei zeigten Untersuchungen auf PEC-Platten eine erhöhte pektolytische Aktivität der Insertionsmutante im Vergleich zu Wildtyp Zellen (Abb. 18). Diese Aktivitätserhöhung spiegelte sich allerdings nicht in Knollenscheibchenversuchen mit Wildtyp Kartoffelknollengewebe wieder. Hier konnte kein Unterschied in der Virulenz zwischen den entsprechenden Stämmen festgestellt werden (Abb. 19). Eigentlich sollte davon ausgegangen werden, dass eine erhöhte pektolytische Aktivität einhergehend mit einer erhöhten Mazeration von Knollengewebe ist. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Abweichung könnten allerdings erst kürzlich veröffentlichte Daten bereitstellen; so konnte gezeigt werden, dass eine negative Korrelation zwischen der Aggressivität von *Erwinia chrysanthemi* Stämmen und deren Osmotoleranz besteht (Gloux *et al.*, 2005). Diese ist besonders unter mikroaeroben Bedingungen ausgeprägt (Gloux *et al.*, 2005). Diese Daten wurden durch das „Ausknocken“ des *ousA* Systems gesammelt. Dies ist das letzte verbleibende Osmoprotektanten-Aufnahmesystem in *Eca*, welches in dieser Arbeit jedoch nicht einer „K.O.“-Mutagenese unterzogen wurde. Das PEC-Medium zur Feststellung der pektolytischen Aktivität, ist ein sehr nährstoffarmes Medium und stellt dementsprechend einen gewissen Stress für die Erwinien-Zellen dar. Demnach könnte das Ausfallen eines Systems zur Aufnahme osmotisch aktiver Substanzen diesen Stress vergrößern. Besonders die nährstoffarmen Bedingungen dieser artifiziellen Umgebung könnten eine Kompensation durch das verbleibende System oder aber auch weitere analoge Systeme erschweren. Da

die Physiologie des Stoffwechsels von *Eca* bei Befall von Kartoffelknollen nur unzureichend erforscht ist, wäre es durchaus möglich, dass die *in-vitro* beobachtete erhöhte pektolytische Aktivität hier ausbleibt.

Die Daten, die im Zuge der phytopathologischen Charakterisierung der erzeugten Mutanten hinsichtlich des Prolintransportes ermittelt wurden, deuten darauf hin, dass diese Systeme zumindest bei Befall von Kartoffelgewebe nicht zur Entfaltung der vollen Virulenz notwendig sind. Auch die leicht erhöhte Prolinkonzentration von NTT-antisense Kartoffeln kann eine erhöhte Resistenz nicht erklären. So zeigten Infiltrationsversuche (Abb. 14), dass erst ab Konzentrationen von 10mM und höher eine deutliche Inhibierung der Gewebemazeration stattfindet. Weiterhin scheint Osmostress bei der Virulenz von *Erwinia* eine Rolle zu spielen (Abb. 18 und Gloux *et al.*, 2005), dieser kann jedoch durch die Existenz verschiedener Systeme abgepuffert werden. Schlussendlich zeigten auch die erzeugten Mutanten (*Eca4218::kan^R*; *Eca3503::kan^R*), dass zumindest in den hier durchgeführten Knollenscheibchentests, eine Defizienz in verschiedenen Systemen zur Aufnahme von Prolin durch eine Redundanz ausgeglichen werden kann und somit nicht entscheidend für eine maximale Virulenz ist (Abb. 13; Abb. 19).

4.3 *Eca*-Mutanten zum Galaktonattransport

Wie schon erwähnt, weisen NTT-antisense Kartoffelknollen veränderte Metabolitlevel im Vergleich zu Wildtyp Knollen auf. Wird nun von einem systemischen „Priming“-Signal ausgegangen und die vegetative Vermehrung von NTT-antisense Knollen berücksichtigt, so setzt dies voraus, dass das systemische Signal bereits im Stolonengewebe vorhanden ist. Demnach müssten also Unterschiede im Xylemexudat von NTT-antisense und Wildtyp Stolonen vorhanden sein. Bereits vorangegangene Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Galaktose im NTT-antisense Xylemexudat im Vergleich zum Wildtypen signifikant erniedrigt ist (Linke, 2003). Die aus Galaktose abgeleitete Uronsäure, also Galakturonsäure, welche in gebundener Form den Hauptbestandteil von pflanzlichem Pektin darstellt, könnte neben einer Nahrungsquelle für *Erwinia* auch als Signal eines Pathogenangriffes dienen (Linke, 2003). Hieraus wurde gefolgert, dass die erniedrigten Galaktose-Werte auch Auswirkungen auf Pektin oder Galaktonatgehalte haben könnten und in ihrer Signalfunktion eine mögliche Erklärung für die bei NTT-antisense Knollen festgestellte Resistenz sein könnte (Linke, 2003). Kritisch betrachtet, könnten die oben aufgeführten Auswirkungen einer erniedrigten Galaktosekonzentration, auch eine erhöhte Suszeptibilität nach sich ziehen. So könnten möglicherweise, geringere Galaktosegehalte Auswirkungen auf Pektat und Galaktonat, Bestandteile der pflanzlichen Zellwand, haben und demnach auch eine Schwächung dieser und somit eine geringere Widerstandsfähigkeit

gegenüber *Erwinia* bewirken. Da diese gegensätzlichen Aussagen jedoch nur spekulativ sind, bedarf es einer experimentellen Aufklärung.

Hierzu bietet sich die Herstellung einer weiteren *Eca* „K.O.“-Mutante an. So zeigten die an Chrysanthemen gesammelten „MicroArray“-Daten, dass die Expression eines Gens, welches für einen putativen d-Galaktonat Transporter kodiert, in *Erwinia chrysanthemi* bei einer Pathogenese deutlich induziert wird. Der *Eca4415* Genlokus kodiert für das entsprechende Homolog dieses Transporters in *Eca* und stellte somit ein weiteres Ziel einer Genunterbrechung dar. Auch in früheren Arbeiten wurde versucht dieses Gen auszuschalten. Hierbei konnte eine Mutagenese durch das Fehlen eines auf *Eca* angepassten Systems nur an *Erwinia chrysanthemi* durchgeführt werden und weiterhin nicht molekular belegt werden (Linke, 2003). Da alle bisherigen Untersuchungen (Linke *et al.*, 2002; Conrath *et al.*, 2003; Linke, 2003; diese Arbeit) mit *Eca* durchgeführt wurden und die beiden Arten sich sowohl genetisch als auch physiologisch unterscheiden, ist eine Unterbrechung des *Eca* eigenen Gens zur weiteren Analyse nahe liegend. So ist bei computergestützten Vergleichsanalysen die putative Funktion des *E.chrysanthemi* Proteins als d-Glukarat-Transporter aufgeführt, jene des *Eca* Proteins als d-Galaktonat Transporter. Weitere Homologe werden auch als putative Phtalat-Transporter angegeben.

Wie unter 3.2.1 beschrieben, konnte erstmals in dieser Arbeit die oben beschriebene *Eca* Mutante generiert und molekular charakterisiert werden. So wurde auch hier eine Unterbrechung des *Eca4415* Genlokus mittels des unter 2.1.5.11 vorgestellten Vektorsystems zur „K.O.“-Mutagenese von *Eca* erreicht (Abb. 22, Abb. 23). Diese Mutante, die auch hinsichtlich einer Unterbrechung am richtigen Genlokus überprüft wurde, lieferte Aufschluss über die Bedeutung einer d-Galaktonat Aufnahme sowie Verwertung für *Eca* als auch ihrer Rolle beim Befall von Kartoffelknollenscheibchen.

So zeigten die durchgeführten phytopathologischen Versuche mit *Eca* Wildtyp und *Eca4415::kan^R* Zellen, dass keine Unterschiede in der Mazeration von Kartoffelknollengewebe feststellbar waren. Weiterhin konnte auch in Versuchen mit PEC-Platten zur Feststellung der pektolytischen Aktivität keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *Eca4415::kan^R* Zellen festgestellt werden. Demnach scheint ein nicht funktionelles ECA4415 Protein nicht essentiell für die Pathogenese von *Eca* auf Kartoffelknollengewebe zu sein. Dementsprechend sind dadurch Veränderungen im Galaktonatgehalt für die Pathogenese von *Eca* als nicht relevant zu betrachten. Falls also eine Veränderung des Galaktoselevels Auswirkungen auf den Galaktonatgehalt hätte (Linke, 2003), so würden diese die Virulenz von *Erwinia* nicht beeinflussen und könnte demnach auch nicht als mögliches Primingsignal in Betracht gezogen werden. Eine Aufnahme von Galaktonat scheint für die Virulenz von *Erwinia* jedoch definitiv nur von untergeordneter Rolle zu sein. Da ein direkter Zusammenhang von Galaktose, Galakturonsäure und Galaktonat nicht

unbedingt vorausgesetzt werden kann, muss auch der direkte Einfluss einer verringerten Galaktosekonzentration auf *Eca* und die Virulenz auf Kartoffelknollengewebe berücksichtigt werden. So ist bekannt, dass der Galaktosemetabolismus bei *Erwinia amylovora* eine entscheidende Rolle bei der Synthese eines Exopolysaccharides (EPS, Amylovoran) spielt, welches auch ein entscheidender Virulenzfaktor dieses Pathogens ist (Kim *et al.*, 2002). Das erwähnte EPS ist jedoch bei *Eca* nicht existent. Des Weiteren ist der Pathogenesemechanismus dieser beiden Erreger völlig unterschiedlich (Toth *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002). Bisher wurde in der Literatur nicht über eine grundlegende Bedeutung des Galaktosemetabolismus bei *Eca* berichtet. Auf der pflanzlichen Seite ist Galaktose als einfaches Epimer von Glukose zu werten. Eine Konversion beider Substanzen in die jeweils andere Form bedarf lediglich einer einfachen enzymatischen Reaktion. Demnach könnte ein geringerer Galaktosepool durch erhöhte Glukosekonzentrationen die in NTT-antisense Pflanzen vorhanden sind, ausgeglichen werden. Galaktose wird in Pflanzen vor allem bei der Zellwandsynthese und der Fertigung von speziellen Galaktolipiden gebraucht (Buchanan, Gruissem, Jones, 2000). Unter Berücksichtigung des Primingzustandes der NTT-antisense Pflanzen könnte eine signifikant geringere Galaktosekonzentration auch als Konsequenz einer Verstärkung von Zellwand- und Membranstrukturen durch eben diesen Alarmzustand erklärt werden. Demnach wären die gemessenen Galaktosewerte (Linke, 2003) nur als weiterer pleiotroper Effekt der „geprimten“ NTT-antisense Kartoffeln zu werten und fungieren selbst nicht als das eigentliche Signal dieses Zustandes.

Eine biochemische Charakterisierung des Transporters wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Einerseits konnte gezeigt werden, dass das ECA4415 Protein vermutlich keine Bedeutung bei der Pathogenese von *Eca* hat und demnach eine biochemische Analyse keine weiteren Informationen hierzu liefern wurde. Andererseits erscheint eine solche hinsichtlich fehlender Indizien über das mögliche Substrat als äußerst schwierig. Im Besonderen unter Berücksichtigung einer teuren und komplexen Synthese der putativ transportierten Metabolite, d-Galaktonat sowie d-Glukarat.

4.4 *Eca*-Mutanten zum Karbonsäuretransport

Zahlreiche Publikationen und Forschungs-Gruppen beschäftigen sich damit herauszufinden, welche Gene bei Befall von suszeptiblem Gewebe durch ein entsprechendes Pathogenen in diesem differentiell reguliert, also induziert oder reprimiert werden (Bell *et al.*, 2004; Okinaka *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005). Auch bei verschiedenen Mitgliedern der Gattung *Erwinia* wurden solche Untersuchungen durchgeführt (Okinaka *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit erfolgten Analysen stellten für die Genloki *Eca4218*, *Eca3503* und *Eca4415* keine essentielle Bedeutung bei der Pathogenese von *Eca*

fest (Kap. 3.1.1; 3.1.2; 3.2). Dennoch gibt es weitere interessante Gene, deren Expression bei der Pathogenese von *Eca* wichtig zu sein scheint. Besonders die Bedeutung von Karbonsäure-Transportern und deren putativer Regulator-Proteine soll im Folgenden diskutiert werden.

4.4.1 Karbonsäure- und Sulfat-Transporter, verschieden und dennoch nicht klar abgrenzbar

Ein weiteres recht interessantes Transportprotein, das bei den durch Okinaka getätigten Analysen an *E.chrysanthemi* auftrat (Okinaka *et al.*, 2002), weist signifikante Ähnlichkeiten zu einem pflanzlichen Karbonsäuretransporter auf. Bei diesem pflanzlichen Transporter handelt es sich um den als DIT1 bezeichneten und sowohl bei *Spinacia oleracea* als auch bei *Arabidopsis thaliana* charakterisierten plastidären Glutamat/2-oxoglutarat Carrier (Renne *et al.*, 2003). Interessanterweise konnten bei BLAST-Analysen mit der entsprechenden Gensequenz aus *E.chrysanthemi* (Okinaka *et al.*, 2002) drei ähnliche Sequenzen im *Eca* Genom identifiziert werden (Kap. 3.3.1.2.1). Als Genprodukte dieser drei DNA-Sequenzen (*Eca3984*; *Eca4400*; *Eca2843*) wurden jedoch immer putative Natrium-gekoppelte Sulfat-Transportproteine angegeben (www.expasy.org).

Die Diskrepanz, die sich aus der Funktion ähnlicher Sequenzen (*SoDIT1*, *AtDIT1*) als Glutamat/2-oxoglutarat Carrier und der den *Eca*-Proteinen durch computergestützte Analysen zugeordnete (Na^+ gekoppelter Sulfat-Transporter) ergibt, scheint auf den ersten Blick nicht vereinbar zu sein. Es ist jedoch bekannt, dass die Klasse der Natrium-gekoppelten divalenten Anionen Transporter (DASS), Transportproteine beinhaltet, die sowohl die Aufnahme von Dikarbonsäuren als auch Sulfat entlang eines elektrochemischen Natrium Konzentrationsgradienten katalysieren (Pajor, 1999a; Pajor, 1999b; Markovich & Murer, 2004; Hall & Pajor, 2005). Weiterhin ist bekannt, dass diese DASS-Gruppe (SLC-13 Genfamilie nach genetischer Nomenklatur des Menschen) eine Sammlung verwandter Proteine darstellt, die über alle Reiche von Lebewesen angetroffen werden können (Pajor, 1999a). Auch die Aufnahme von Citrat, eine Trikarbonsäure und ein wichtiges Intermediat des Krebs-Zyklus, durch ein Mitglied dieser DASS-Familie konnte nachgewiesen werden (Pajor, 1999a; Pajor, 1999b).

Die Einordnung und Einschätzung der Funktion solcher Proteine bedarf demnach einer biochemischen Charakterisierung und einer Analyse der katalytischen Transporteigenschaften. Auch bei den drei identifizierten Gensequenzen aus *Eca* ist eine direkte Zuordnung der putativen Funktion mittels Aminosäure „Alignment“-Analysen sehr schwierig. So zeigten solche Studien, dass trotz der funktionellen Einordnung der drei *Eca* Genprodukte als Sulfatcarrier, sowohl putative Dikarbonsäure- als auch Citrat-Carrier aus *E.coli* signifikante Ähnlichkeiten aufweisen und demnach als Homologe gelten (Abb. 29). In

diesen Analysen ist auch ein putativer 2-oxoglutarat/Malat Carrier aus *Staphylococcus aureus* Stamm RF122 zu finden. Dies ist besonders interessant, da erst kürzlich ein Protein aus *S.aureus* Mu50 identifiziert und charakterisiert werden konnte, welches ein Mitglied der oben erwähnten DASS-Gruppe ist und den Transport der Dikarbonsäuren Fumarat, Succinat und Malat in diesem Bakterium katalysiert (Hall & Pajor, 2005).

4.4.2 Biochemische Funktionsanalyse des ECA3984 Proteins

Um die biochemische Funktion der drei Genprodukte mit signifikanten Ähnlichkeiten zu Karbonsäure Aufnahmesystemen in *Eca* zu klären, wurden „K.O.“-Mutanten für die entsprechenden DNA-Sequenzen hergestellt. Da das ECA3984 Protein zu den beiden anderen Proteinen (ECA4400 und ECA2843) die größte Homologie aufwies und auch am ähnlichsten zu den im „Alignment“ aufgeführten Proteinen erschien (Abb. 29), wurde dieser Locus als erster der unter 2.1.5.11 beschriebenen „K.O.“-Mutagenese unterzogen. Die hierbei isolierten Mutanten wurden wiederum mittels einer molekularen Charakterisierung auf eine Unterbrechung der entsprechenden Gensequenz untersucht und verifiziert (Kap. 3.3.1.1). Die so erzeugten Zellen die defizient für ein funktionelles *Eca3984* Genprodukt sind, konnten anschließend für biochemische Analysen und zur Phänotypisierung benutzt werden.

Um eine putative Funktion hinsichtlich einer Karbonsäure-Aufnahme und Verwertung zu untersuchen, eignen sich besonders Wachstumstest auf Minimalmedien. Hierbei ist vor allem eine wie unter 3.3.1.1 beschriebene „K.O.“-Mutante von großem Nutzen. So, können auftretende Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet und interpretiert werden.

4.4.2.1 Citrat-Verwertung des *Eca* Wildtypen und der 3984::*kan*^R Mutante

Eines der oben beschriebenen Minimalmedien zur Überprüfung der Karbonsäureaufnahme und -Verwertung, ist das Simmons Citrat Medium (SCM). Wie unter 3.3.1.2.2 beschrieben, können nur Citrat-verwertende (positive) Bakterien auf diesem Medium wachsen. Bei Versuchen zur Citratverwertung konnte festgestellt werden, dass gegenüber dem *Eca* Wildtypen der sich durch eine positive Citratverwertung und einem deutlichen Wachstum kennzeichnete, die *Eca3984::kan*^R Mutante nahezu keinerlei Wachstum zeigte (Abb. 30). Da es sich bei ECA3984 um ein Transportprotein handelt, welches zwölf putative Transmembransegmente besitzt (TMPred, www.EMBnet.org) und signifikante Ähnlichkeiten zu Karbonsäuretransportern aufweist, lässt dies auf eine Funktion als Citrat-Transporter schließen. Fehlt dieser Citrat-Transporter oder ist er aufgrund einer Unterbrechung der kodierenden DNA-Sequenz nicht mehr funktionell, so ist die entsprechende *Eca* Mutante nicht in der Lage Citrat (das bei einer Anzucht auf SCM als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht) aufzunehmen und zu verstoffwechseln. Dies erklärt die negative Citratverwertung und das Ausbleiben des Wachstums der *Eca3984::kan*^R

Mutante auf SCM (Abb. 30). Auch ein weiteres Experiment belegte, dass die beschriebene Insertionsmutante nicht mehr zum Wachstum auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle befähigt ist. So konnte bei Anzuchtversuchen in M9 Minimalmedium mit 10mM Citrat nur der *Erwinia* Wildtyp eine OD600 von 0,8 erreichen und somit wachsen. Die *Eca3984* Insertionsmutante zeigte in solchen Versuchen aufgrund der negativen Citratverwertung kein Wachstum und wurde folglich in weiteren Analysen als *cit1::kan^R* Mutante bezeichnet (Abb. 32). Im Gegensatz zu diesem drastischen Wachstumsunterschied zwischen dem *Erwinia* Wildtypen und der *cit1::kan^R* Mutante im Citrat-Minimalmedium war in LB-Vollmedium absolut keine Beeinträchtigung des bakteriellen Wachstums beider Stämme zu beobachten (Abb. 31). Dies bedeutet demnach, dass bei einer Kultivierung unter *in-vitro* Bedingungen in Vollmedium ein funktionelles Cit1 Protein (*ECA3984*) für *Eca* nicht essentiell ist. Unter selektiven *in-vitro* Bedingungen mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle ist ein funktioneller Cit1 Transporter jedoch unbedingt notwendig um ein Wachstum von *Eca* zu ermöglichen.

4.4.2.2 Biochemische Charakterisierungen der Citrat-Aufnahme durch *Eca*

Um die Funktion des Cit1 Proteins, als Citrat-Transporter zu betätigen, wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem Citrat durch *Erwinia* Wildtyp Zellen im Vergleich zu *cit1::kan^R* Zellen gemessen. Hierbei konnte für den *Erwinia* Wildtypen eine sigmoidal verlaufende Aufnahme-Charakteristik beobachtet werden (Abb. 33), wohingegen die *cit1::kan^R* Mutante über die gesamte Versuchszeit keinerlei Aufnahme von Citrat zeigte (Abb. 33). Der bei Versuchen an *Eca* Wildtypen beobachtete komplexe Verlauf der zeitabhängigen Citrat-Aufnahme, welche bis 100 s relativ gering erscheint um dann deutlich anzusteigen und schließlich nach etwa fünf Minuten die Sättigung zu Erreichen, kann verschiedene Gründe haben. Zum einem wäre ein Fütterungseffekt von Citrat auf die bakterielle Atmungskette eine mögliche Erklärung. Hierbei führt die anfängliche Aufnahme von Citrat zu einem stärkeren Ablauf des TCA-Zyklus, wodurch die Elektronen-Transportkette gespeist und demnach eine größere *pmf* aufgebaut wird. Hierdurch könnte dann bei einem Protonen-gekoppelten Symport von Citrat mit zunehmender Zeit durch einen größer werdenden Gradienten eine verstärkte Aufnahme bis zu einem steady-state und folglich einer Sättigung stattfinden. Weiterhin könnte eine Aufnahmecharakteristik wie die des Cit1 Proteins, aus Modifikation von Menge, Affinität oder Aktivität des Proteins resultieren. Hierbei würde z.B. durch ein Regulatorsystem die Präsenz von Citrat mittels eines Sensors oder eine Sensorkinase perzipiert werden und dann als Signal, bei einem Zwei-Komponentensystem, über einen Response-Regulator welcher die Expression weiterer Cit1-Proteine kontrolliert, weitergeleitet werden. Die größere Menge an Cit1 Protein die hierbei entsteht, könnte dann wiederum den

sigmoidalen Kurvenverlauf erklären. Die Existenz solcher Regulationsmechanismen bei Bakterien ist weit verbreitet. So wird z.B. beim UhpC/T System zur Aufnahme von Glucose-6-Phosphat im Gegentauch mit Phosphat die Expression des Transporters UhpT, durch eine konzentrationsabhängige Induktion der Expression in Gegenwart von Glucose-6-Phosphat, mittels des Sensors UhpC gesteuert (Schwöppe *et al.*, 2002; Schwöppe *et al.*, 2003). Auch für den Citrat-Transport sind ähnliche Systeme beschrieben (Bott, Meyer & Dimroth, 1995). Da jedoch bei den Transportversuchen eine Steigerung der relativen Aufnahmerate von Citrat um nahezu das fünffache innerhalb von nur 100 Sekunden zu beobachten war (Abb. 33), kann eine Protein *de-novo* Synthese, die bei den oben beschriebenen Mechanismen ablaufen müsste, keine Erklärung für den beobachteten Kurvenverlauf sein. Es könnte jedoch zu einer Modifizierung und somit Aktivierung von bestehenden Cit1 Transportproteinen kommen, die sich in einer erhöhten Aktivität und somit in einer verstärkten Citrataufnahme ausdrückt. Dies könnte z.B. auf einen kooperativen Transportmechanismus zurückzuführen sein. So konnte durch Analysen anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Transportproteine die der unter 4.3.1 vorgestellten DASS-Familie angehören, komplexe Transportcharakteristika aufweisen die auf Kooperativität (Hill-Koeffizienten größer als eins), des Substrattransportes zurückzuführen sind (Pajor, 1999a).

Um weiterhin den Citrattransport durch das Cit1 Protein näher zu charakterisieren, wurde das Substratspektrum des Transporters determiniert. Hierzu wurden die unter 3.3.1.2.4 gezeigten Effektorversuche durchgeführt. Diese zeigten, dass es sich bei Cit1 um einen hochaffinen Citrat-spezifischen Transporter handelt. So vermochte einzig die Zugabe von nicht-markiertem Citrat im zehnfachen Überschuss eine signifikante Verdrängung des beobachteten Transportes und folglich eine Verringerung der Transportrate (Abb. 34). Weitere Karbonsäuren zeigten nur eine sehr geringe Beeinflussung des Citrat-Transportes. Einzig Malat, konnte die Aufnahme an markiertem Citrat um etwa 20% verdrängen und somit als weiteres Substrat des Cit1-Proteins in Frage kommen (Abb. 34). Weiterhin konnte ein sehr starker Effekt des Protonophors CCCP gezeigt werden (Abb. 34). Hierbei konnte durch Zugabe von 50µM CCCP, die Transportrate des Cit1-Proteins auf ungefähr 10% jener ohne Protonophor verringert werden. Dieser Effekt spricht für einen Protonen abhängigen Symport von Citrat durch das Cit1-Protein. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Karbonsäuren mit kurzer Kohlenstoffkette und einem kleineren I^+ Effekt (leichtere Abgabe eines Protons, stärkere Säure) eine erhöhte Citrataufnahme durch Steigerung des transmembranen elektrochemischen Gradienten, bewirken (Abb. 34). Da durch eine Zugabe von nicht markiertem Malat im zehnfachen Überschuss gegenüber dem Aufnahmesubstrat Citrat eine Verringerung des Citrattransportes um 20 % erreicht werden konnte, sollte dieser Einfluss genauer untersucht werden. Hierbei wurde festgestellt, dass selbst bei der ständigen

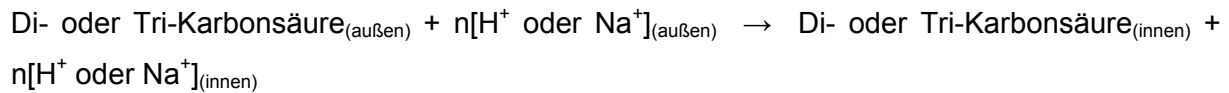
Gegenwart von einem zehnfachen Überschuss an Malat, eine zeitabhängige Aufnahme von radioaktiv markiertem Citrat nicht signifikant gestört wurde (Abb. 35). Da in Pflanzenzellen, die Konzentrationen von Malat jene von Citrat deutlich übersteigen (Tab. 3.1), ist es wichtig zu überprüfen, ob bei gleichzeitiger Gegenwart von hohen Malatkonzentrationen eine Citrataufnahme über das Cit1-Protein stattfinden kann. Nach den in Abb. 35 gezeigten Daten kann demnach geschlossen werden, dass selbst bei einer zehnfach höheren Malatkonzentration eine Aufnahme von Citrat durch das Cit1-Protein katalysiert werden kann. So ist Malat kein bevorzugtes Substrat des Cit1-Proteins und wird in *Eca* durch andere Transportsysteme, die in folgenden Kapiteln behandelt werden, aufgenommen.

4.4.2.3 Klassifizierung des Cit1 Transportproteins aus *Eca* als neues Mitglied der DASS-Transporterfamilie

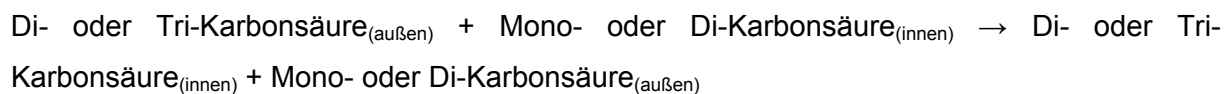
Die beobachteten biochemischen Transporteigenschaften des Cit1 Proteins (Kap. 3.3.1.2) und die strukturellen Charakteristika ermöglichen die Einordnung dieses Proteins in drei verschiedene Transporterfamilien. Diese drei Familien gehören zur Ionen Transporter Superfamilie (Prakasch *et al.*, 2003) und werden als Citrat- (TC 2.A.11), als 2-Hydroxykarboxylat (2-HCT) (TC 2.A.24), und als Anionen:Na⁺-Symporter- (DASS) Transporterfamilie (TC 2.A.47) bezeichnet (Transport Classification Database; TCDB, www.TCDB.org).

Mitglieder der Citrat-Transporterfamilie sind vor allem die Magnesium-Citrat Transportsysteme (CitM). Diese transportieren Citrat im Komplex mit Mg²⁺ und werden nur in Gegenwart von Citrat exprimiert (Boorsma *et al.*, 1996; Warner & Lolkema, 2002; Li & Pajor, 2002). In Gegenwart von Glukose konnte für das CitM Protein aus *Bacillus subtilis* eine vollständige Repression der Transkription beobachtet werden (Warner *et al.*, 2000). Auch Glycerin, Inositol, Succinat und Glutamat führen zu einer Repression der *citM* Expression in *B.subtilis* (Warner *et al.*, 2000). *Eca* besitzt zwei Gensequenzen die für CitM Homologe kodieren. Die Gensequenz *Eca3984 (cit1)* gehört nicht zu diesen Sequenzen. Zwar kann ein Transport von Mg²⁺-Citrat in *Eca* beobachtet werden (Abb. 36D), dieser unterscheidet sich jedoch durch eine von dem Cit1-Protein abweichende Zeitabhängigkeit und ist zudem nur nach Anzucht von *Eca* Wildtyp Zellen in M9-Minimalmedium mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle (Endkonzentration 10mM) zu messen (Abb. 36C und D). Demnach wird der Transport von Mg²⁺-Citrat in *Eca* höchstwahrscheinlich durch eines der oben angegebenen CitM Homologe katalysiert. Der Nachweis einer Citrataufnahme auch nach Anzucht von Zellen in Vollmedium, als auch das beobachtete Substratspektrum und die ermittelten Strukturdaten zeigen eindeutig, dass das Cit1-Protein kein Mitglied der Citrat-Transporterfamilie ist (TC 2.A.11).

Die verbleibenden zwei Klassen (2-HCT-, DASS-Familie) beinhalten Proteine mit verschiedenen Funktionen und Substraten, können jedoch strukturell klar voneinander abgegrenzt werden. Mitglieder der 2-HCT Familie katalysieren die Aufnahme von Citrat und/oder Malat im Symport mit Protonen oder Natrium-Ionen (TCDB). Der generelle Transportmechanismus dieser Proteine kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:



oder,



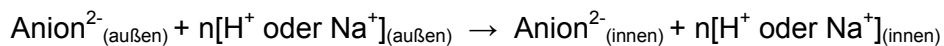
Tab. 4.1: Homologie-Vergleiche von Citrat-Transportern unterschiedlicher Protein-Familien. Die miteinander verglichenen Proteine sind jeweils oben und links in der Tabelle mit entsprechender Bezeichnung angegeben. Die jeweiligen Zahlen stehen jeweils für die Anzahl in Prozent an identischen (erste Zahl) und ähnlichen (zweite Zahl nach Schrägstrich) Aminosäuren. Die gezeigten Analysen wurden nach einer ClustalW-Analyse und einer Verarbeitung der entsprechenden Sequenzen in Genedoc erzielt (Kap. 2.4). Cit1(*Eca*), Citrat-Transporter aus *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*; CitS(*K.pneu*), Na⁺/Citrat-Transporter aus *Klebsiella pneumoniae* (TC 2.A.24), CitM(*B.sub*), Mg²⁺-Citrat-Transporter aus *Bacillus subtilis* (TC 2.A.11), TTDT(*E.coli*), Tartrat-Transporter aus *Escherichia coli* (TC 2.A.47).

	Cit1(<i>Eca</i>)	CitS(<i>K.pneu</i>)	CitM(<i>B.sub</i>)	TTDT(<i>E.coli</i>)
Cit1(<i>Eca</i>)	-	8 / 20	10 / 23	30 / 48
CitS(<i>K.pneu</i>)	-	-	11 / 24	9 / 26
CitM(<i>B.sub</i>)	-	-	-	10 / 29
TTDT(<i>E.coli</i>)	-	-	-	-

Proteine der 2-HCT Familie wurden bisher sowohl in gram⁻ als auch gram⁺ Bakterien identifiziert, blieben jedoch auf dieses Vorkommen beschränkt. Strukturell zeichnen Sie sich dadurch aus, dass Sie elf putative Transmembransegmente besitzen und jeweils zwei in entgegengesetzter Richtung repetitive Bereiche aus fünf Transmembranhelices mit einer zusätzlichen N-Terminalen Helix aufweisen. Strukturvergleiche des Cit1 Proteins mit Mitglieder dieser Familie (TmPred, www.expasy.org, Genedoc), waren nicht ausreichend signifikant um eine Zuordnung in diese Gruppe zu unterstützen (Tab. 4.1). Dies ist sehr interessant, da bisher alle charakterisierten Transporter die ein Wachstum von Enterobakterien auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle sowohl aerob als auch anaerob zulassen, in dieser zu finden sind (van der Rest *et al.*, 1990, 1991; Schwarz & Oesterheld, 1985). Im Falle von *Klebsiella pneumoniae* ermöglichen ein solches Wachstum unter anaeroben Bedingungen der Na⁺-abhängiger Citrat-Symporter CitS (Pos & Dimroth, 1996;

Kästner *et al.*, 2003) und CitW ein Citrat/Acetat Gegentaucher (Kästner *et al.*, 2002) sowie aerob, das CitH-Protein.

Die einzig verbleibende Klasse an Transportproteinen der das Cit1 Protein angehören kann, ist die DASS-Proteinfamilie. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe deren Mitglieder in allen Reichen der Lebewesen zu finden sind. Die meisten der bisher biochemisch charakterisierten Proteine transportieren Di- und Tri-Karbonsäuren und Intermediate des TCA-Zyklus, Sulfat als auch Phosphat im Symport mit Natrium-Ionen. Interessanterweise gehört jedoch auch das SoDIT1 Protein dieser Familie an, welches als plastidärer 2-oxoglutarat/Malat Transporter charakterisiert werden konnte (Renne *et al.*, 2003). Der generelle Transportmechanismus von Proteinen dieser Familie kann vereinfacht mit folgender Gleichung beschrieben werden:



Um dies auf den Citrat-Transport durch das Cit1-Protein zu übertragen, müsste einfach protoniertes Citrat (HCitrat^{2-}) gekoppelt an einen Protonen- oder Natriumgradienten aus der äußeren Umgebung in *Eca* Zellen transportiert werden. Da die Zugabe von 1mM Natriumchlorid zur Erzeugung eines größeren transmembranen Natriumgradienten allerdings nicht zu einer Steigerung, sondern zu einer Verringerung der Transportrate des Cit1 Proteins führte, deutet dies auf einen Protonensymport von Citrat hin. Um diese These genauer zu überprüfen bedarf es jedoch weiterer Versuche z.B. mit spezifischen Hemmern des Natriumgekoppelten Transportes (DIDS). Weiterhin sollten auch Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit und der Beeinflussung des Citrat-Transportes durch ΔpH , $\Delta\Psi$ und ΔpNa^+ durchgeführt werden. Nicht zuletzt zeigten auch strukturelle Analysen die Verwandtschaft des Cit1 Proteins mit Mitgliedern der DASS-Familie (Tab. 4.1; www.membranetransport.org). Demnach ist das Cit1 Protein dieser Familie zugehörig und katalysiert einen hochaffinen Citrattransport, angetrieben durch einen transmembranen Protonengradienten. Cit1 ist damit das erste bakterielle DASS-Mitglied, das Citrat transportiert und höchstwahrscheinlich nicht durch einen Natriumgradienten energetisiert wird.

4.4.3 Bedeutung des Cit1-Proteins für die Virulenz von *Eca* bei Befall von Kartoffelknollengewebe

Durch die biochemische Charakterisierung und die Identifizierung des Cit1-Proteins als hochaffiner Protonen-gekoppelter Citrat-Transporter wird eine phytopathologische Charakterisierung hinsichtlich der Bedeutung für die Virulenz von *Eca* überaus interessant. Das Wissen um die Funktion dieses Proteins erlaubt dementsprechend auch eine genaue Interpretation der phytopathologischen Daten hinsichtlich der Stellung des Cit1-Proteins im

bakteriellen Stoffwechsel und der bei Pathogenese stattfindenden Veränderungen. Auch die unterschiedlichen Metabolitgehalte zwischen Wildtyp und NTT-antisense Kartoffeln können herangezogen werden um die Bedeutung des Cit1-Proteins bei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen zu untersuchen.

Um eine erste Einschätzung der Virulenz der *cit1::kan^R* Mutante und demnach auch der Bedeutung des Cit1-Proteins zu erhalten, wurden Knollenscheibchen Experimente und PEC-Platten Versuche zur Überprüfung der pektolytischen Aktivität durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die *cit1::kan^R* Mutante eine signifikante Reduktion bei der Mazeration von Kartoffelknollengewebe zeigte und eine geringere pektolytische Aktivität als der *Eca* Wildtyp in Versuchen mit PEC-Platten aufwies (Abb. 38, Abb. 39). Dass diese verringerte Gewebemazeration von Kartoffelknollen auf ein nicht funktionelles Cit1-Protein zurückzuführen ist, konnte durch Komplementation der *cit1::kan^R* Mutante gezeigt werden (Kap. 3.3.1.2.5; Abb. 37). So verhielten sich komplementierte „K.O.“-Mutanten entsprechend *Eca* Wildtyp-Zellen und wiesen keinerlei Unterschiede gegenüber diesen in Kartoffelknollenexperimenten auf (Abb. 39).

Somit ist der *cit1* Genlokus, der für einen Citrat-Transporter kodiert ein gutes Beispiel eines Typ III-Virulenzfaktors, der von großer Bedeutung für den Befall von Kartoffelknollengewebe durch *Eca* ist. Welche Funktion jedoch ein intaktes Aufnahmesystem im Stoffwechsel von *Eca* bei Befall von Kartoffelgewebe erfüllt oder wie es die Virulenz von *Eca* beeinflusst bedurfte weiterer Versuche. Da Citrat für *Eca* eine Kohlenstoff- und Energiequelle darstellt, liegen eine Auswirkung und Beeinflussung des bakteriellen Wachstums nahe. Um dies zu untersuchen, wurden Versuche zur Ermittlung der colony forming units (CFU) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass bei Fehlen des Cit1-Proteins ein schwächeres bakterielles Wachstum vorliegt (Abb. 40). So konnte in diesen Experimenten eine Verringerung von 40% hinsichtlich der CFUs bei *cit1::kan^R* Mutanten nach Befall und Wachstum auf Wildtyp Kartoffelknollengewebe gegenüber dem *Eca* Wildtypen festgestellt werden (Abb. 40). Komplementierte „K.O.“-Mutanten zeigten diese Unterschiede im Vergleich zu *Eca* Wildtypen nicht. Dies bedeutet, dass einer funktionellen Citrat-Aufnahme eine große Bedeutung beim Befall von Kartoffelknollen zukommt und dass diese mit dem bakteriellen Wachstum zusammenhängt. Ein Defekt in der Citrat-Aufnahme würde demnach ein deutlich schlechteres bakterielles Wachstum, eine schlechtere Kolonialisierung von Kartoffelgewebe und somit auch eine verminderte Gewebemazeration nach sich ziehen. Eine genauere Einordnung der Citrat-Aufnahme sowie deren Bedeutung für den Stoffwechsel und die Pathogenese von *Eca* sollen in Kap. 4.4.7 erfolgen.

4.4.3.1 Citrat ein ambivalentes Metabolit bei der Mazeration von Wildtyp und NTT-antisense Kartoffelgewebe durch *Eca*

Die vorangegangenen Analysen bezüglich des *cit1* Gens zeigten, dass dieses für einen Citrat-Transporter kodiert der notwendig ist um *Eca* ein Wachstum auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle zu ermöglichen (Kap. 3.3.1.2). Weiterhin ist dieses Protein von großer Bedeutung beim Befall von Kartoffelknollengewebe und für das bakterielle Wachstum in dieser Umgebung (Kap. 3.3.1.3).

Bei Vorarbeiten bezüglich der NTT-antisense Kartoffelpflanzen konnten zahlreiche Effekte in Verbindung mit der erhöhten Resistenz von Knollengewebe gegenüber *Eca* beobachtet werden. So wurde in dieser Arbeit schon auf die veränderten Metabolitgehalte hingewiesen (Geigenberger *et al.*, 2001). Im Besonderen sind hierbei die stark erhöhten Zucker- und die verringerten Stärkegehalte zu erwähnen. Eine mögliche Auswirkung dieser Zuckergehalte auf die Resistenz der NTT-antisense Knollen gegenüber verschiedenen Pathogenen wurde bereits untersucht (Linke, 2003). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen von Primärmetaboliten sich nur auf heterotrophes Gewebe ausdehnen. Im autotrophen voll ausgewachsenen Kartoffelblättern von NTT-antisense Pflanzen waren dagegen keine Unterschiede bezüglich dem Gehalt an freien Zuckern oder Stärke zu messen (Linke, 2003). Da jedoch auch das NTT-antisense Blattgewebe eine erhöhte induzierbare Resistenz gegenüber *Phytophthora infestans* zeigte, scheint auch hier der bei Knollengewebe beobachtete „Priming“-Zustand vorzuliegen (Conrath *et al.*, 2002). Durch diese Analysen konnte gezeigt werden (Linke, 2003), dass die erhöhte Resistenz, die bei NTT-antisense Pflanzen beobachtet wird, nicht ausschließlich und direkt auf den hohen Zuckergehalten und einer als „high sugar resistance“ bekannten höheren Widerstandskraft gegen Pathogene, beruht (Horsfall & Dimond, 1957). Dies wurde unterstützt durch Untersuchungen an weiteren transgenen Kartoffelpflanzen und deren Knollen. So zeigen Knollen mit verringerter Aktivität der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) eine ähnlich erhöhte Resistenz gegenüber *Eca*, diese ist jedoch konstitutiv und nicht in jedem Detail mit der Resistenz von NTT-antisense Knollen übereinstimmend (Linke, 2003). Zwar können auch bei diesen transgenen AGPase-Kartoffelknollen erhöhte Glukosewerte einhergehend mit geringeren Stärkegehalten gemessen werden (Müller-Röber *et al.*, 1997), dass dieses gemeinsame Merkmal jedoch keine Erklärung der beobachteten Resistenz ist, belegten weitere Analysen. So wiesen *A. thaliana* PGMp-„Knock-out“ Pflanzen (defizient für die Expression der plastidären Phospho-Glucomutase) die absolut stärkefrei sind (Casper *et al.*, 1985) keine Merkmale einer erhöhten Pathogenresistenz auf (Linke, 2003). U-Inv Kartoffelknollen, welche eine cytosolische oder apoplastische Inverstase exprimieren und demnach stark erhöhte Gehalte an reduzierenden Zuckern aufweisen jedoch im Gegensatz

zu AGPase- und NTT-antisense Knollen stark verringerte Saccharose-Konzentrationen enthalten (Hajirezaei *et al.*, 2000), weisen sogar eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einem Gewebefall von *Eca* auf (Linke, 2003).

Auch wenn die Resistenz von NTT-antisense Kartoffeln nicht auf die Primärmetabolite zurückgeführt werden kann, so sind die Veränderungen dieser jedoch alleine auf die geringe Aktivität des plastidären ATP/ADP Gegentaucher und des Energiemetabolismus zurückzuführen, die sich besonders auf das heterotrophe Gewebe auswirkt (Tjaden *et al.*, 1998). Dies betrifft vor allem den heterotrophen Plastiden und dementsprechend die Stärke-Synthese und den Kohlenstoffmetabolismus. Der plastidäre Metabolismus ist mit dem mitochondrialen Metabolismus allerdings eng verbunden und dementsprechend beeinflussbar. Demnach lag es nahe, nach der weiter oben diskutierten Bedeutung von Citrat für *Eca* und den Befall von Knollengewebe die entsprechenden Citratgehalte in Knollengewebe von Wildtyp und NTT-antisense Pflanzen zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass NTT-antisense Knollen bis zu dreieinhalbfach geringere Citratlevel im Vergleich zu Wildtypknollen aufweisen (Tab. 3.1). Des Weiteren zeigten Versuche in Kooperation mit Dr. Geigenberger (MPI Golm) und der Hilfe von Thomas Reinhold (AG Neuhaus), dass der Gehalt an Citrat in Knollengewebe während dem Befall durch *Erwinia* großen Veränderungen unterliegt, was für weitere Karbonsäuren nicht beobachtet werden konnte (Tab. 3.2; Tab. 3.3). Diese für Citrat beobachteten Veränderungen wurden bei NTT-antisense Knollengewebe nicht festgestellt (Tab. 3.2) So könnte Citrat möglicherweise als eine Kohlenstoff- und Energiequelle beim Wachstum von *Eca* auf Kartoffelgewebe benutzt werden. Da Citratgehalte bei NTT-antisense Knollen per se niedrig sind, kann *Eca* diese in einem geringeren Umfang als bei Wildtypknollen verwerten.

Um die Vermutung einer Bedeutung von Citrat sowohl für die Virulenz von *Eca* als auch die Resistenz der NTT-antisense Pflanzen zu überprüfen wurden Inokulationsversuche mit nicht behandelten als auch infiltrierten NTT-antisense Knollen durchgeführt. Hierbei zeigte sich die für NTT-antisense Knollen charakteristische Resistenz gegenüber einem Befall durch *Eca* im Vergleich zu Wildtyp Knollen (Abb. 41). Die *cit1::kan^R* Mutante konnte erwartungsgemäß auf den NTT-antisense Knollen (die geringe Citratlevel aufweisen) fast keine Symptome einer Knollennassfäule entwickeln (Abb. 41). Zusätzlich führte eine Infiltration von 10mM Citrat in Knollengewebe sowohl bei WT-Knollen als auch bei NTT-antisense Knollen bei Inokulation mit *Eca* Wildtyp Zellen zu einer drastisch erhöhten Gewebemazeration (Abb. 42). Eine leichte Erhöhung konnte bei analogen Versuchen auch für die *cit1::kan^R* Mutante beobachtet werden (Abb. 43). Gemäß der Annahme, dass ein funktionelles Cit1-Protein für ein Wachstum auf Citrat und der Verwendung als Energiequelle notwendig ist, erscheint eine Steigerung der Mazeration durch Citrat-Infiltration für die *cit1::kan^R* Mutante widersprüchlich. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass nicht

bekannt ist ob eines der beiden verbleibenden Cit1 Homologe auf Kartoffelgewebe einen geringfügigen Citrattransport vermittelt und dass weiterhin Citrat einen Effekt auf das Gewebe selbst haben könnte. Ein möglicher Begleiteffekt der Citrat-Infiltration wird noch in einem weiteren Kapitel diskutiert werden.

Die beobachtete Steigerung der Virulenz von *Eca* auf Kartoffelknollengewebe, ist des Weiteren auf Citrat begrenzt und hängt nicht mit einem Fütterungseffekt der Bakterien zusammen. Dies zeigten Versuche bei denen neben Citrat Kartoffelknollenscheibchen auch mit gleichen Konzentrationen an Malat und Glukose infiltriert wurden. So konnte analog zu früheren Versuchen belegt werden, dass eine Erhöhung von apoplastischen Glukosekonzentrationen nicht zu einer Beeinflussung der Resistenz von NTT-antisense Knollen und/oder der Virulenz von *Eca* führt (Linke, 2003; Abb. 44). Citrat vermochte dagegen die Mazeration von Wildtyp als auch NTT-antisense Knollengewebe signifikant zu steigern (Abb. 44). Eine Beeinträchtigung durch Malat konnte in diesen Versuchen nicht festgestellt werden (Abb. 44). Bei analoger Versuchsdurchführung und Inokulation mit *cit1::kan^R* Zellen konnte die schon bei vorangegangenen Versuchen festgestellte verminderte Virulenz im Vergleich mit dem *Eca* Wildtypen festgestellt werden (Abb. 45). Auch hier zeigte Glukose wiederum keinen Einfluss. Eine Steigerung der Gewebemazeration durch Citratinfiltration konnte zwar beobachtet werden, fiel jedoch deutlich geringer aus bei Inokulationen mit Wildtyp Zellen (Abb. 45). Interessanterweise führte eine Infiltration mit Malat zu Gewebemazerationen, die identisch zu solchen durch den *Eca* Wildtyp waren. Da möglicherweise eine Kompensation des Stoffwechseldefektes der *cit1::kan^R* Mutante hierbei vorliegt, lässt dies darauf schließen, dass wie schon vermutet, der Karbonsäuremetabolismus bei der Pathogenese von *Eca* eine große Bedeutung hat. Weiterhin ist die Fähigkeit der *cit1::kan^R* Mutante zur Gewebemazeration (die Virulenz) also per se nicht beeinträchtigt, vielmehr liegt eine Stoffwechseldefizienz vor, die sich auf das bakterielle Wachstum bei Befall von Kartoffelknollen auswirkt.

Dass, Citrat aber nicht nur von großer Bedeutung für den bakteriellen Stoffwechsel, sondern auch für die Resistenz von Kartoffelknollengewebe ist, konnte durch „Northern Blot“ Versuche gezeigt werden. Diese Versuche wurden erst nach Beendigung der hier gezeigten Analysen durch Thomas Reinhold (AG Neuhaus) durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die induzierbare und verstärkte Akkumulation von abwehrrelevanten Transkripten (PR-Genen), die NTT-antisense Pflanzen kennzeichnet, durch eine Citrat-Infiltration signifikant verringert werden kann (Anhang V.). Dementsprechend muss also von einer dualen Rolle des Metabolits Citrat bei Befall von Knollengewebe durch *Eca* ausgegangen werden. Wie genau Citrat Einfluss auf die Expression von PR-Proteinen und Resistenz von Kartoffelknollengewebe nimmt, bedarf weiterer Analysen. Mögliche Erklärungen hierzu werden aber in Kap. 4.4.7 erörtert werden. Dort wird auch eine mögliche

Involvierung in ein bisher noch nicht beschriebenes „Priming“ welches die Breitbandresistenz von NTT-antisense Knollen erklären könnte, diskutiert werden.

4.4.4 ECA4400 ein Homolog des Cit1 Proteins und ein weiterer Citrat-Transporter?

Wie unter 4.4.1 beschrieben konnten zwei weitere Homologe zu dem beschriebenen und charakterisierten Cit1 Protein in *Eca* nachgewiesen werden. Für die *Eca4400* Gensequenz die für eines dieser Homologe kodiert, wurde eine weitere „K.O.“-Mutante innerhalb dieser Arbeit hergestellt. Da diese jedoch erst zu einem späten Zeitpunkt zur Verfügung stand konnte keine ausführlichere Charakterisierung angegangen werden. Deshalb werden lediglich einige Einblicke bezüglich der Biochemie und der phytopathologischen Bedeutung des ECA4400-Proteins vorgestellt.

4.4.4.1 Einordnung der Biochemie des ECA4400-Proteins bezüglich der Citratverwertung und Auswirkungen eines unterbrochenen *Eca4400* Gens auf die Pathogenese von *Eca*

Durch die Charakterisierung und die Identifizierung des Cit1-Proteins als Protonen/Citrat Symporter, lag eine ähnliche Funktion des ECA4400-Proteins nahe. Um dies zu überprüfen, wurden Anzuchtversuche auf SCM-Medium durchgeführt. Hierbei lag zwar ein schlechteres Wachstum auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle der entsprechenden *Eca4400::kan^R* Mutante im Vergleich zum Wildtypen vor, dieses fiel aber bei Weitem nicht so dramatisch aus als bei der *cit1::kan^R* Mutante (Abb. 49). Eine mögliche Funktion dieses Proteins könnte analog zum plastidären SoDIT1 Transporter ein 2-oxoglutarat/Malat Antiport sein. Weiterhin könnte es sich auch um ein Homolog zu dem bereits charakterisierten CitT-Protein aus *E.coli* handeln, welches unter anaeroben Bedingungen einen Citrat „Homoexchange“ oder einen Antiport von Citrat gegen Succinat, Fumarat oder Tartrat katalysiert (Pos *et al.*, 1998).

Die Versuche hinsichtlich der Citratverwertung von *4400::kan^R* Zellen zeigten jedoch, dass die Bedeutung des ECA4400 Proteins für das Wachstum auf Citrat zumindest geringer ist als das für den Cit1 Transporter der Fall ist. Ob sich dies bei Befall von Kartoffelgewebe durch *Eca* genauso manifestiert wurde mittels Scheibchenversuchen ermittelt. So zeigte auch die *Eca4400::kan^R* Mutante eine leicht geringere Virulenz als der *Eca* Wildtyp, was in einer reduzierten Gewebemazeration resultierte. (Abb. 50). Die Reduktion der Gewebemazeration fiel für die *Eca4400::kan^R* Mutante jedoch schwächer aus als für die

cit1::kan^R Mutante. In diesem Zusammenhang scheint der Verlust eines ECA4400 Proteins im Vergleich zum Cit1 Transporter besser kompensiert werden zu können.

4.4.5 Malat-Aufnahme durch *Eca* und Identifizierung des ECA0620 Proteins als Malat-Carrier

Im Zuge der Charakterisierung des Cit1-Proteins konnte gezeigt werden, dass Malat den Citrat-Transport zwar beeinflusst, jedoch kein bevorzugtes Substrat dieses Transporters zu sein scheint (Abb. 35). Dennoch konnte eine Malat-Aufnahme durch *Eca* mittels Transportversuche mit radioaktiv markiertem Malat nachgewiesen werden (Abb. 54). Weiterhin zeigten diese Experimente, dass sich Malat- und Citrat-Aufnahme in ihrem Substratspektrum deutlich voneinander abgrenzen (Abb. 34; Abb. 55). Mittels dieser Effektorversuche konnte auch ein starker Einfluss von CCCP auf die Malataufnahme beobachtet werden. Dies deutet auf eine *pmf* Abhängigkeit dieses Transportes hin.

Wie bereits erwähnt besitzen Enterobakterien mehrere Systeme zur Aufnahme von C4-Karbonsäuren. Anteilmäßig sind dabei unter aeroben Bedingungen das Dct-System und unter anaeroben Bedingungen das DcuB-System die wichtigsten Transportproteine zur Aufnahme dieser Karbonsäuren. *Erwinia* besitzt alle hier erwähnten und beschriebenen C4-Karbonsäure Transportsysteme der Enterobakterien. Da unter 4.4.3.1 auch eine Benutzung von Malat als mögliche Energiequelle beim Befall von Knollengewebe diskutiert wurde, sollte dies durch Herstellung und Charakterisierung einer weiteren Mutante untersucht werden. Wie oben bereits erwähnt ist der nur anaerob und in Abwesenheit von Nitrat exprimierte *dcuB* Carrier der wichtigste, um unter diesen Bedingungen die Fumarat-Atmung von Enterobakterien zu sichern (Zientz *et al.*, 1999). *DcuA* dagegen wird konstitutiv exprimiert und kann einen Ausfall von *dcuB* kompensieren (Zientz *et al.*, 1999). Der Genlokus *Eca0620* kodiert für ein solches *DcuA* Homolog in *Eca* und war Ziel einer „K.O.“-Mutagenese zur Untersuchung des Malat-Transportes. Wie Abb. 56 zeigt konnte durch das „Ausknocken“ dieses Gens eine geringfügige Reduktion des Malat-Transportes beobachtet werden. Da ein Großteil der Malat-Aufnahme allerdings noch gemessen wurde, scheint zumindest unter den gegebenen Versuchsbedingungen das ECA0620 Protein nicht hauptsächlich für diese Aufnahme verantwortlich zu sein. Zumindest zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass *Eca* dazu befähigt ist Malat als Kohlenstoffquelle aufzunehmen und dies durch die Präsenz von mehreren redundanten Systemen unter einer Vielzahl von Umweltbedingungen möglich ist.

In Knollenscheibchenversuchen zur Feststellung der Virulenz von *Eca0620::kan^R* Zellen konnte kein signifikanter Einfluss auf die Mazeration von Wildtypknollengewebe beobachtet werden. Dies kann eben dadurch bedingt sein, dass weitere Carrier die Defizienz

eines funktionellen ECA0620 Protein kompensieren und demnach eine Beeinträchtigung der Virulenz erst bei dem Verlust mehrerer Malat-Aufnahmesysteme zustande käme.

4.4.6 Regulation und Anpassung des Karbonsäurestoffwechsels von *Eca* bei Befall von Knollengewebe

Bisher wurden vor allem Mutanten vorgestellt bei denen gezielt Transportergene ausgeschaltet worden waren. Wie schon erwähnt kann ein solches Gen, wenn das entsprechende Produkt eine Bedeutung für Virulenz und Wachstum auf suszeptiblem Gewebe hat, in die Klasse der Typ III Virulenzgene eingeordnet werden (Wasenaar & Gaastra, 2001). Die Klasse der Typ II-Faktoren umfasst vor allem Regulatoren, die die Expression der direkten Virulenzfaktoren regulieren. In Folgenden soll die Bedeutung eines Regulators beschrieben werden, welcher keinen direkten Einfluss auf Virulenzfaktoren ausübt, wohl aber eine große Bedeutung für den Stoffwechsel und die Kolonialisierung von suszeptiblen Pflanzengewebe durch phytopathogene Bakterien hat.

Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt, ist der Karbonsäuremetabolismus beim Befall von Kartoffelknollengewebe durch *Eca* und dem Verlauf der Pathogenese von großer Bedeutung. Um einen solchen Stoffwechsel zu koordinieren bedarf es allerdings weiterer Proteine (Regulatoren, Transkriptionsfaktoren etc.). Mittels bioinformatischer Untersuchungen (BProm; www.softberry.com), konnte innerhalb der Promoterregion des *cit1* Gens eine mögliche FNR-Bindestelle lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt). Beim FNR-Protein (Fumarate-Nitrate-Respiration) handelt es sich um einen Regulator, der eine Vielzahl von Genen (weit über 100) beeinflusst (Constantinidiou *et al.*, 2005). Generell ist die Aufgabe dieses Proteins eine Veränderung des Stoffwechsels von aeroben zu anaeroben Bedingungen zu koordinieren (Lin & Iuchi, 1991). So werden Gene des aeroben Stoffwechsels (z.B. des TCA-Zyklus) reprimiert, wohingegen solche, die Funktionen im anaeroben Stoffwechsel erfüllen, induziert werden. Im Zusammenwirken mit anderen Regulatoren, wie dem Zwei-Komponentensystem ArcAB (Aerobic respiratory control) und Faktoren zur Steuerung des Stickstoffmetabolismus, kommt demnach der Anpassung des Stoffwechsels auf äußere Einflüsse eine große Bedeutung zu. Da auch der Karbonsäurestoffwechsel einer solchen Regulation unterliegt (Bott, Meyer & Dimroth, 1995) und möglicherweise eine Expression des *cit1* Genes durch diese Regulation betroffen ist, wurde versucht mögliche Zusammenhänge, anhand einer *Eca fnr*-, „K.O.“-Mutante aufzuklären.

Vergleichsstudien zu bereits beschriebenen *E.coli fnr*-Mutanten zeigten, dass die *Eca fnr::kan^R* Mutante aerob, sowohl auf Glukose als auch auf Fumarat als einziger Kohlenstoffquelle zum Wachstum in der Lage war (Abb. 62). Unter anaeroben Bedingungen wies die *fnr::kan^R* Mutante im Vergleich zum *Eca* Wildtypen einen dramatischen

Wachstumsunterschied auf. Dies konnte vor allem beobachtet werden, wenn Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle angeboten wurde. Unter diesen Bedingungen konnte auch beim Wildtypen ein reduziertes Wachstum festgestellt werden. Wurde jedoch zusätzlich Nitrat angeboten, war ein verbessertes Wachstum des *Eca* Wildtypen zu beobachten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass unter diesen Bedingungen die Bakterienzellen ihren Stoffwechsel auf anaerobe Atmung mit Nitrat als Elektronen-Endakzeptor umstellen. *Erwinia* als auch *E.coli* galten bislang als unfähig Glycerin unter anaeroben Bedingungen fermentativ als einzige Energiequelle zu nutzen (Toraya *et al.*, 1980), neueste Untersuchungen sprechen jedoch dafür, dass dies sehr wohl möglich ist (Dharmadi *et al.*, 2006). Im Gegensatz zum Wachstum des *Eca* Wildtypen konnte allerdings die *fnr*-„K.O.“-Mutante unter keiner der gegebenen Bedingungen (mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle) wachsen (Abb. 63). Dies ist auf das Unterbrechen des *fnr* Gens zurückzuführen. Dessen Genprodukt ist hauptsächlich dafür verantwortlich den bakteriellen Stoffwechsel auf anaerobe Atmung und Energiegewinnung umstellen. Ein fehlendes oder nicht funktionelles FNR-Protein würde unter den oben beschriebenen Bedingungen, demnach analog zu den erwähnten *E.coli* Mutanten zu einem stark beeinträchtigten Wachstum führen. Des Weiteren wurde getestet, ob *Eca* anaerob auf Fumarat (einer Di-Karbonsäure) als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Auch hier konnte ein normales Wachstum des Wildtypen beobachtet werden. In diesem Zusammenhang kann das Wachstum, auf die Fumarat-Atmung zurückgeführt werden (Lengeler, Drews, Schlegel, 1999). Die Regulation vieler Enzyme die an diesem Stoffwechselweg beteiligt sind, verläuft über FNR. So konnte gezeigt werden, dass bei *Wolinella succinogenes* aber auch bei *E.coli*, die Aufnahme von Di-Karbonsäuren (Fumarat) über Di-Karbonsäure Carrier (DcuABC) ebenfalls durch FNR gesteuert wird. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass die *fnr* Mutante bei anaeroben Anzuchtversuchen mit Fumarat als einziger Kohlenstoffquelle kein Wachstum zeigte (Abb. 63). Ein anaerobes Wachstum mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle stellt für fakultativ anaerobe Enterobakterien wie *Erwinia* oder *E.coli* keine größeren Probleme da. Unter diesen Bedingungen stehen den Bakterien über Gärung im Normalfall genug Energie und Kohlenstoffgerüste zur Verfügung, um noch wachsen zu können. Der Hauptknotenpunkt des Stoffwechselweges der Gärung in *E.coli*, das Enzym Pyruvat-Formiat Lyase, wird maßgeblich durch FNR, aber auch durch weitere Regulatoren in seiner Expression gesteuert. Erstaunlicherweise kann jedoch eine *E.coli fnr* Mutante trotz der großen Bedeutung einer Pyruvat-Spaltung für die Gärung und der Abhängigkeit des Schlüsselenzyms von diesem Regulator fermentativ auf Glukose (wenn auch sehr viel langsamer als der Wildtyp) wachsen (Lengeler, Drews, Schlegel, 1999). So konnte auch hier gezeigt werden, dass der *Eca* Wildtyp unter anaeroben Bedingungen in der Lage ist Glukose zu vergären (Abb. 62). Die *fnr::kan^R* Mutante hingegen zeigte ein sehr schwaches Wachstum (Abb. 63). Da die Auswertung der in Kap. 3.3.4.2 gezeigten Versuche

zu einem frühen Zeitpunkt erfolgte, könnte dies das drastisch retardierte Wachstum der *fnr::kan^R* Mutante erklären. Demnach ist durchaus ein solches Wachstum, wenn auch deutlich langsamer als das des Wildtypen, fermentativ bei längeren anaeroben Inkubationen der *fnr* Mutante auf Glukose als einziger C-Quelle zu beobachten. Alles in allem bestätigen diese Versuche eine erfolgreiche „K.O.“-Mutagenese des *fnr* Gens anhand der Analogien zu charakterisierten *E.coli* Mutanten.

Von besonderem Interesse war allerdings die Überprüfung der Citrat-Verwertung einer *Eca fnr*-Mutante. Aus diesem Grunde wurde das Wachstum von *Eca* WT Zellen als auch *cit1::kan^R* und *fnr::kan^R* Zellen unter anaeroben Bedingungen auf SCM-Platten untersucht. Hierbei bestätigten sich die schon in früheren Versuchen beobachtete positive Verwertung von Citrat des *Eca* Wildtypen, als auch die deutlich schlechtere der *cit1::kan^R* Mutante (Abb. 64). Die *fnr* Mutante, die unter den vorher diskutierten Versuchen anaerob ein signifikant schlechteres Wachstum als der *Eca* Wildtyp gezeigt hatte, war auch auf SCM-Medium zu keinem Wachstum in der Lage (Abb. 64). Dies zeigt eindeutig, dass das FNR-Protein eine Rolle bei der Citrat-Verwertung spielt. Die Vermutung, dass das *cit1* Gen durch FNR induziert wird, kann durch dieses Versuchsergebnis unterstützt werden. Dies und weitere Defekte im fermentativen Stoffwechsel der *fnr* Mutante können eine Erklärung für die stark beeinträchtigte Citrat-Verwertung sein, welche schlechter ist als jene der *cit1::kan^R* Mutante.

Da davon auszugehen ist, dass eine *fnr::kan^R* Mutante durch das mögliche Fehlen von funktionellem Cit1 Protein eine ähnlich reduzierte Virulenz aufweisen kann als eine *cit1::kan^R* Mutante, wurden zur Überprüfung dieser These Kartoffelknollenscheibchen Versuche durchgeführt. Tatsächlich zeigte sich in diesen Versuchen, dass analog zu der *cit1::kan^R* Mutante, die *fnr::kan^R* Mutante eine signifikant reduzierte Virulenz aufweist (Abb. 65). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass durch das Fehlen eines funktionellen FNR Regulators zum einem der Karbonsäurestoffwechsel beeinträchtigt ist und zum anderen höchstwahrscheinlich eine *cit1* Expression nicht stattfindet. Um dies jedoch noch zu genauer zu untersuchen und folglich zu bestätigen, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. So könnten analog zur *cit1* Mutante Infiltrationsversuche mit der *fnr* K.O-Mutante aufzeigen ob, auch hierbei ähnliche Reaktionen, z.B. bezüglich einer Steigerung der Gewebemazeration durch Erhöhen der apoplastischen Citratkonzentration, zu beobachten sind. Weiterhin müssten „Northern-Blot“ Analysen zeigen, dass bei der *fnr*-Mutante kein *cit1* Transkript aufgrund des fehlenden FNR Signals detektiert werden kann. Dies würde belegen, dass eine *cit1* Expression bei Befall von Kartoffelknollengewebe direkt durch FNR gesteuert wird.

Weitere unabhängige Untersuchungen bestärken die Hypothese einer Verflechtung von Karbonsäurestoffwechsel, FNR-Regulation und dem Befall von Knollengewebe. So ist es

verwunderlich, dass ein Effekt bei aeroben Knollenscheibchentests zu beobachten ist, da unter solchen Bedingungen das FNR Protein durch sein unter hohen Sauerstoffkonzentrationen labiles [4Fe-4S] Zentrum, katalytisch inaktiv ist (Moore *et al.*, 2006). Hierzu konnte schon relativ früh durch unabhängige Untersuchungen gezeigt werden, dass bei Befall von Kartoffelknollengewebe, besonders beim Übergang von mazeriertem zu noch nicht befallenen Gewebe, sehr sauerstoffarme Bedingungen vorliegen (Smid *et al.*, 1993). So sinkt der Gehalt an Sauerstoff von gesättigten Konzentrationen (290 μM bei 20°C) auf ca. 60 μM in mazeriertem Gewebe ab um dann in noch nicht befallenen Gewebe Werte von 5-30 μM aufzuweisen (Smid *et al.*, 1993). Weiterhin wurde beobachtet, dass Promotoren, die nur unter anaeroben Bedingungen induziert werden und deren Expression durch Promoter-GUS Fusionen nachgewiesen wurde, bei Befall von Knollengewebe durch *Eca* selbst bei ständiger Zufuhr sterilen Sauerstoffes stark induziert werden (Bülow, 2001). Weiterhin ist bekannt, dass bei Befall von Knollengewebe eine Induktion der anaeroben und durch FNR gesteuerten Nitrat-Atmung stattfindet (Smid *et al.*, 1993). Demnach muss *Eca* also eine starke Plastizität des Stoffwechsels aufweisen, um unter den schnellen Veränderungen der Umgebung bei Befall und Mazeration von Knollengewebe, seinen Stoffwechsel ebenso schnell und effektiv anzupassen. So ist es durchaus vorstellbar, dass eine Kolonialisierung von intaktem Kartoffelknollengewebe (im Apoplasten) durch *Eca* anfänglich unter anoxischen Bedingungen abläuft. Bei fortschreitender Gewebe-Mazeration würde das Bakterium zur Energiegewinnung auf anaerobe Stoffwechselwege wie Stickstoff-, Fumarat- und/oder auch Citrat-Gärung zurückgreifen. Schließlich, würde nach weiterer Gewebemazeration, dem Freiwerden besserer Energie- und Kohlenstoffquellen wie z.B. Glukose, sowie steigender Sauerstoffkonzentrationen, (nach Auflösen des Zellzusammenhaltes) der bakterielle Stoffwechsel wieder hin zur aeroben Energiegewinnung verändert werden. Diese aufwendige Regulation des bakteriellen Stoffwechsel, zur optimalen Nutzung von Kohlenstoffquellen und zur Energiegewinnung, sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen, bedarf demnach neben entsprechenden Aufnahmesystemen auch Regulatoren wie z.B. dem FNR-Protein.

4.4.7 Bedeutung und ambivalente Funktion von Citrat und dem Karbonsäurestoffwechsel sowie seiner Regulation für die Pathogenese von *Eca* auf Kartoffelknollengewebe

In den bisherigen Kapiteln wurden die beobachteten Versuchsergebnisse einzeln für sich betrachtet und diskutiert. Hierbei waren Überschneidungen sowie eine Korrelation verschiedener Experimente feststellbar. Das folgende Kapitel zielt darauf ab, alle Ergebnisse in ein Gesamtkonzept zu integrieren, um einen abschließenden Überblick zu erreichen. Vor

allem hinsichtlich Citrats, soll sowohl die bakteriellen Seite der Virulenz als auch jene der pflanzlichen Resistenz, einschließlich der stattfindenden Interaktionen, bei Befall von Wildtyp und NTT-antisense Kartoffelpflanzen, genauer verstanden werden.

Da über den genauen Stoffaustausch und die Konzentrationen von Citrat in verschiedenen pflanzlichen Zellkompartimenten wenig bekannt ist, kann an dieser Stelle darüber nur gemutmaßt werden. Sicher ist dennoch, dass Citrat und vor allem Malat, sowie weitere Karbonsäuren in pflanzlichen Zellen und insbesondere im Apoplasten ubiquitär vertreten sind.

Im Folgenden gilt es nun den direkten Einfluss von Citrat auf den bakteriellen Stoffwechsel und die Pathogenese von *Eca* zu erläutern. Ein entscheidender Punkt ist hierbei die Aufnahme von Citrat durch *Eca* mittels eines Transportsystems, um dann dem eigenen Stoffwechsel zur Verfügung zu stehen. Hierbei spielt das Cit1-Protein, wie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte eine entscheidende Rolle (Abb. 30, 32, 33). Die Expression des *cit1* Gens, so konnte des Weiteren gezeigt werden wird durch die Präsenz des FNR-Regulatorproteins beeinflusst (Abb. 64). Dieses wiederum ist nur unter anaeroben Bedingungen aktiv (Moore *et al.*, 2006). Auch die DcuABC Systeme zur Aufnahme von Di-Karbonsäuren (z.B. Malat, Fumarat und Succinat) werden durch FNR reguliert und sind ebenfalls unter anaeroben Bedingungen aktiv (Zientz *et al.*, 1999; Ullmann *et al.*, 2000; Janausch *et al.*, 2002). Diese Metabolite können folglich nach ihrer Aufnahme durch das Bakterium zum Antreiben des bakteriellen Stoffwechsels genutzt werden.

Unter aeroben Bedingungen können die aufgenommenen Karbonsäuren, so auch Citrat, in den TCA-Zyklus eingespeist, die entstehenden Reduktionsäquivalente zur Gewinnung von Energie genutzt, oder über die Glukoneogenese oder den Glyoxylat-Zyklus zum Aufbau von Kohlenstoffgerüsten weiterverarbeitet werden. So zeigten Untersuchungen, dass die beiden erwähnten Stoffwechselwege (Glukoneogenese und Glyoxylat-Zyklus), für *Xanthomonas campestris* *pv. campestris* von großer Bedeutung für die *in-planta* Virulenz sind (Tang *et al.*, 2005). Auch für eine Vielzahl anderer Pathogene konnte nachgewiesen werden, dass diese Zyklen, zur Erzeugung von Glukose aus C2- und C3-Einheiten sowie Intermediaten des TCA Zyklus, von großer Bedeutung bei der Kolonialisierung von Pflanzengewebe und demnach der Entfaltung maximaler Virulenz sind (Idnorum & Howlett, 2002; Lorenz & Fink, 2001; McKinney *et al.*, 2000; Vereecke *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Eine stark reduzierte Citrat-Versorgung durch Fehlen des Cit1 Transporters, könnte also unter aeroben Bedingungen ein verringertes Wachstum bewirken. Die geringere Biomasse würde dementsprechend zu schwächeren Krankheitssymptomen führen, die im Endeffekt zu einer reduzierten bakteriellen Virulenz führen. Aber auch unter anaeroben Bedingungen könnte ein fehlendes Cit1-Protein ein stark geschwächtes Wachstum verursachen. So könnten z.B. weder die Fumarat, noch die Nitrat-Atmung bei einer stark verringerten

Aufnahme von Karboxylaten störungsfrei ablaufen. Gleiches würde auch für Gärungsprozesse wie die Citrat-Fermentation zutreffen. Zwar fehlt *Eca* ein Schlüsselenzym (Oxalacetat Dekarboxylase Na⁺ Pumpe) zur Fermentation von Citrat nach dem Mechanismus von *K.pneumoniae* (Bott, Meyer & Dimroth, 1995), neuere Untersuchungen konnten jedoch eine Citratgärung bei Bakterien wie z.B. *Eca* feststellen (Lengeler, Drews, Schlegel, 1999). Demnach würde eine gestörte Karbonsäure-Aufnahme und insbesondere eine Citrat-Aufnahme unweigerlich zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führen (Nam *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005) und somit eine verringerte Virulenz erklären.

Des Weiteren sind die bisher geschilderten Stoffwechselvorgänge durch eine starke Regulation des FNR-Proteins gekennzeichnet (Lin & Iuchi, 1991; Sawers & Suppmann, 1992). Eine Störung oder Beeinträchtigung dieser Regulation durch ein nicht funktionelles FNR-Protein würde demnach in einer ebenso starken, wenn nicht sogar stärkeren Beeinträchtigung des bakteriellen Wachstums resultieren. Dies würde dann wiederum zu einer verringerten Virulenz führen wie sie in dieser Arbeit beobachtet werden konnte (Abb. 65).

Bei einer Gewebemazeration, vor allem bei der betrachteten Interaktion von *Eca* und Kartoffelknollengewebe, wird beim Abbau der Speicher-Stärke eine große Menge an Zuckern frei. Diese Zucker stellen natürlich eine deutlich bessere Kohlenstoff- und Energiequelle dar als Karbonsäuren. Dennoch könnte auch unter solchen Bedingungen eine Citrat-Aufnahme von großer Bedeutung für *Eca* sein. So zeigten unabhängige Untersuchungen, dass bei Befall von suszeptiblem Gewebe, Pathogene meistens einer starken Eisen-Limitierung unterliegen. Unter solchen Bedingungen produzieren und sekretieren Bakterien Eisen-bindende Strukturen, so genannte Siderophore (Mahe *et al.*, 1995; Sauvage *et al.*, 1996; Sokol *et al.*, 2000). Einer dieser Siderophore, Achromobactin, ist von großer Bedeutung für die frühe Virulenz und das Kolonisieren von Chrysanthemen durch *Erwinia chrysanthemi* und beruht auf einer von Citrat abgeleiteten Struktur (Mahe *et al.*, 1995). Eine Beeinträchtigung der Achromobactin-Produktion und dementsprechend eine Eisenlimitierung, würde das *in-planta* Wachstum von *Eca* deutlich erschweren und hierdurch eine verringerte Virulenz bewirken.

Wie unter Kap. 4.4.3.1 beschrieben beeinflusst Citrat auch, in einer bisher noch nicht beschriebenen und charakterisierten Weise, die Resistenz der pflanzlichen Zelle. So konnte durch diese Arbeit herausgefunden werden, dass eine Infiltration mit Citrat nicht nur die Gewebemazeration und die Virulenz von *Eca* steigert, sondern auch die Expression von PR-Genen, einem nicht unwesentlichen Teil der pflanzlichen Resistenzantwort, reprimiert (Reinhold, AG Neuhaus). Da mehrere Unbekannte, wie Verteilung und Konzentration von Citrat im Apoplasten, als auch in verschiedenen zellulären Kompartimenten vorhanden sind, können zur Erklärung dieses Phänomens bisher jedoch nur Hypothesen aufgestellt werden.

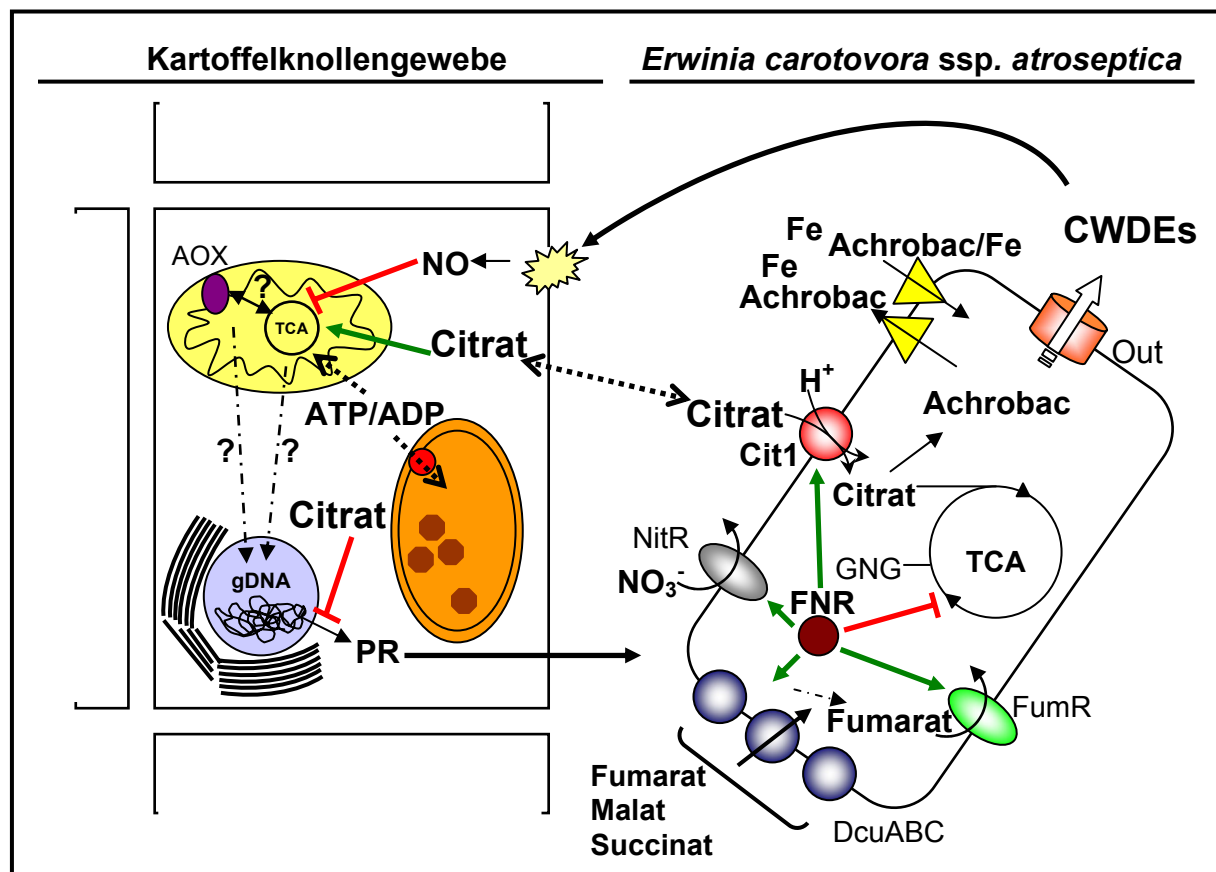


Abb. 68: Schema zur Stellung und Bedeutung von Citrat im pflanzlichen und bakteriellen Stoffwechsel. Gezeigt sind (in vereinfachter Darstellung) links, eine pflanzliche Zelle des Kartoffelknollengewebes und rechts, eine *Eca* Bakterienzelle. Die am Interaktionsnetzwerk beteiligten und im Text erläuterten Proteine sind angegeben. Unbekannte Wechselwirkungen sind mit unterbrochenen Pfeilen gekennzeichnet, direkte Wechselwirkungen dagegen mit durchgezogenen Pfeilen. Hemmende Ereignisse und Regulationen sind durch rote Blocklinien, stimulierende durch grüne Pfeilen dargestellt. Abkürzungen: Achrobac = Achromobactin (Citrat/Eisen-Siderophor); AOX = Alternative Oxidase; CWDEs = Zellwandabbauende Enzyme; DcuABC = Dikarbonsäureaufnahmesysteme; Fe = Eisen; FumR = Fumarat-Reduktase; FNR = Fumarat-Nitrat-Respiration Regulator; gDNA = genomische DNA; GNG = Glukoneogenese; H^+ = Protonen; NitR = Nitrat-Reduktase; NO = Stickstoff-Monoxid; NO_3^- = Nitrat; Out = Proteinsekretion; PR = Pathogen related Proteins; TCA = Tri-Karbonsäurezyklus; Cit1 = Citrat/Protonensymporter; (plastidärer ATP/ADP Gegentauscher in rot, Stärkekörner in dunkelbraun). Weitere Erklärungen: siehe Text.

Wird eine pflanzliche Zelle von *Eca* angegriffen, so verläuft dies anfänglich über das Ausscheiden von Zellwand-abbauenden Enzymen. Bei der fortschreitenden Zerstörung des pflanzlichen Zellverbundes und der bakteriellen Pathogenese kann eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) beobachtet werden (Delledonne *et al.*, 1998). Diesem Molekül konnte vor allem durch zwei Arbeiten (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998) eine essentielle Signalfunktion bei der pflanzlichen Resistenz zugeteilt werden. Da NO, aber auch aus Nitrit (z.B. aus der Reduktion von Nitrat bei der bakteriellen anaeroben Atmung) vor allem unter sauren Bedingungen (hohe Karbonsäurelevel) entstehen kann (Lengeler, Drews,

Schlegel, 1999), könnte es durch Freiwerden dieses Signalmoleküls zu einer differentiellen Expression verschiedener pflanzlicher Gene kommen. So wurde bereits eine Inhibierung der Aconitase, einem Enzym des TCA-Zyklus, aus Tabakpflanzen durch NO festgestellt (Navarre *et al.*, 2000). Dies wirkt sich auf den „turn-over“ des TCA-Zyklus aus, was wiederum eine Beeinflussung der Alternativen Oxidase (AOX) bewirkt. Dieses charakteristische Enzym pflanzlicher Mitochondrien ist molekular und biochemisch gut untersucht und aufgrund der Involvierung in verschiedensten Stoffwechselwegen ein sehr interessantes Forschungsobjekt (Meeuse, 1975; Laties, 1982; Moore & Siedow, 1991; McIntosh, 1994). Bei der Wirt-Pathogenbeziehung zwischen Tabakpflanzen und dem Tabak-Mosaik Virus konnte gezeigt werden, dass die AOX eine zentrale Rolle im Signalprozess, unter Zusammenwirken mit Salicylsäure und der Expression von PR-Proteinen, bei der Verteidigung gegen dieses Pathogen einnimmt (Chivasa & Carr, 1998). Eine solche differentielle Genexpression könnte auch bei der Wechselwirkung von Kartoffelknollen und *Eca* vorliegen. Nicht zuletzt ist beobachtet worden, dass alternde Kartoffelknollen eine erhöhte Aktivität der AOX und der alternativen Atmung aufweisen (Hiser & McIntosh, 1990).

Nach den oben aufgeführten möglichen Auswirkungen von Citrat, einerseits auf den bakteriellen und andererseits auf den pflanzlichen Stoffwechsel, kann das in Abb. 68 dargestellte Schema zur dualen Funktion von Citrat abgeleitet werden. Demnach deuten die ermittelten Ergebnisse, wie in Abb. 68 zu beobachten ist, darauf hin, dass hohe Citrat-Konzentrationen den bakteriellen Stoffwechsel antreiben und somit das Wachstum, die Kolonialisierung und die Virulenz von *Eca* steigern. Wird diese Versorgung reduziert oder gar verhindert, zum einem durch ein inaktives Aufnahmesystem (Cit1), zum anderen durch das Fehlen spezifischer Regulatoren (FNR), so kommt es zu einer reduzierten Virulenz. Geringe Citrat Konzentrationen, wie sie z.B. in NTT-antisense Knollen vorliegen, führen demnach auch zu einer geringeren bakteriellen Virulenz von *Eca*.

Für das pflanzliche Knollengewebe stellen auf der anderen Seite geringe Citrat-Konzentrationen, wie bereits beschrieben, einen Schutz gegen Pathogene dar. Weiterhin könnte eine verringerte Citrat-Konzentration die Kartoffelknolle auch in einen Alarmzustand, einen „Priming“-Zustand, versetzen. So könnte entweder direkt durch niedrige Citratgehalte, oder aber durch das Wahrnehmen solcher über bisher nicht bekannte Mechanismen ein entsprechender Alarmzustand von Pflanzengewebe ausgelöst werden. Citrat, das in relativ geringen Konzentrationen *in-planta* vorliegt und durch die bakterielle Aufnahme (zum Aufbau von Biomasse und Wachstum) signifikant verringert wird (Tab. 3.1, 3.2, 3.3), eignet sich hierdurch auch besonders als Signal-Molekül. Ein geringes Citrat-Level, wie in NTT-antisense Knollen, könnte demnach einen Angriff durch *Eca* simulieren und hierdurch ein „Priming“ des Gewebes bewirken, was in Konsequenz zu einer erhöhten Resistenz führt. Eine Erhöhung der Citratkonzentration, beispielsweise durch Infiltration, könnte demnach in

einem ähnlichen Mechanismus eine höhere Suszeptibilität von Wildtypknollen und eine Aufhebung der Resistenz von NTT-antisense Knollen bewirken (wie in Abb. 42 und Abb. 44 beobachtet).

4.5 Transportproteine aus *M.grisea*, Virulenzfaktoren per Analogie

Wie bereits deutlich wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Transportproteine durchaus von Bedeutung für die Virulenz eines Pathogens sein können. Dies ist nicht nur bei *Eca* der Fall, sondern kann auch auf weitere Pathogene übertragen werden. Durch die Kooperation mit der AG Thines (IBWF) und die Unterstützung von Dipl. Biol. Thomas Becker (AG Thines, IBWF) konnten Gene aus *M.grisea* untersucht werden, die für putative Transportproteine kodieren und von denen bekannt ist, dass sie bei Pathogenese induziert werden (Becker, Daten nicht publiziert). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die Bedeutung solcher Proteine für die Virulenz nur anhand einer ausführlichen molekularen, biochemischen und phytopathologischen Charakterisierung zu ermitteln. Die molekulare und phytopathologische Charakterisierung dieser Gene und deren Genprodukte konnten durch die Arbeit von Dipl. Biol. T. Becker (IBWF) als Anhaltspunkt für eine grobe Einordnung der putativen biochemischen Funktion dieser Transportproteinen genutzt werden.

So konnte das Genprodukt der *rig2* Gensequenz aus *M.grisea* eine Hefemutante (22Δ8AA), die nicht mehr auf Prolin als einziger Stickstoffquelle bei Abwesenheit von NH₄Cl wachsen kann, komplementieren (Abb. 66, 67). Demnach sollte es sich bei diesem Genprodukt um einen Prolintransporter handeln. Aufnahmeversuche mit radioaktiv markiertem Prolin zeigten jedoch keinen Unterschied in der zeitabhängigen Akkumulation dieses Substrates zwischen komplementierten Hefezellen und 22Δ8AA-Zellen mit leerem Vektor. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei Komplementationsversuchen mit 1,5mM Prolin (einzige Stickstoffquelle) eine relativ hohe Konzentration eingesetzt wird. Bei Transportversuchen wurde jedoch aufgrund von bereits bekannten und charakterisierten Prolin-Transportern mit viel geringeren Konzentrationen (50μM) gearbeitet. Des Weiteren ist bekannt, dass manche Proteine aufgrund relativ geringer Transportaktivitäten zwar Hefemutanten komplementieren können, durch Transportversuche allerdings nicht zu charakterisieren sind (Wieczorke *et al.*, 2003).

Weiterhin könnte es sich bei Prolin nur um ein Nebensubstrat und nicht unbedingt um das Hauptsubstrat des entsprechenden *M.grisea* Transporters handeln. Eine vakuoläre Lokalisierung dieses Transportproteins wäre ebenfalls möglich (Mitteilung, Dipl. Biol. T.Becker, AG Thines). Diese könnte eine weitere Erklärung für die beobachteten Transportraten sein. So ist bekannt, dass manche Transportproteine, die den sekretorischen

„Pathway“ durchlaufen, in heterotrophen Systemen einer Fehlleitung unterliegen (Wieczorke *et al.*, 2003). Dementsprechend könnte in diesem Fall eine geringe Menge an Protein in die Hefe-Plasmamembran geleitet werden und für eine funktionelle Komplementation sorgen. Der Großteil an aktiven Transportern wäre dagegen im inneren Membransystem vorzufinden und könnte durch Transportversuche an intakten Hefezellen nicht erfasst werden. Zudem ist der benutzte Hefestamm 22 Δ 8AA nicht defizient für die Aufnahme osmotisch aktiver Substanzen wie z.B. Glycin-Betain oder Cholin. Daher können keine weiteren Studien zum Transport solcher Substanzen durch Rig2 an dem hier benutzten Hefestamm durchgeführt werden. Um dies dennoch zu testen, müsste auf weitere Hefemutanten zurückgegriffen werden. Es wäre jedoch durchaus vorstellbar, dass solche Substanzen durch *M.grisea* und Rig2 aufgenommen werden.

So ist die Osmo-Regulation und Aufnahme kompatibler Solute nicht nur bei *M.grisea*, sondern auch bei weiteren Pilzen von großer Bedeutung (de Jong *et al.*, 1997; Money, 1997). Hierbei sind Signalsysteme, wie z.B. das HOG-System, (high osmolarity glycerol pathway) das erstmals bei *S.cerevisiae* untersucht wurde (Brewster *et al.*, 1993), von zentraler Bedeutung, um auf die veränderten Umweltbedingungen mit einer entsprechenden Anpassung von Stoffwechsel und Genexpression zu reagieren. So ist bekannt, dass viele filamentös wachsenden Pilze, sowie Hefen, eine Osmo-Homeostase durch Akkumulation von Polyolen (Glycerol), oder aber auch Prolin und weiteren osmotisch aktiven Substanzen, regulieren (Davis *et al.*, 1999). Auch bei *M.grisea* konnte die Bedeutung der Glycerol-Akkumulation für den Aufbau des Turgordrucks in Appressorien und dem Eindringen in Pflanzengewebe nachgewiesen werden (Howard & Ferrari, 1989; Chumley & Valent, 1990; de Jong *et al.*, 1997; Money *et al.*, 1997). Der hierbei entstehende enorme Turgordruck (8MPa) und die hohen Glycerinkonzentrationen (bis zu 3M), sowie die steuernden Netzwerke und der Anteil weiterer kompatibler Solute, sind bisher jedoch noch nicht genau aufgeklärt (DeZwaan *et al.*, 1999; Dixon *et al.*, 1999; Thines *et al.*, 1999). Demnach könnten durch das Rig2-Protein osmotisch aktive Substanzen, wie Prolin oder Glycin-Betain, in die Vakuole transportiert und gespeichert werden, um dann bei Aufbau des Turgordrucks und dem Eindringen in Pflanzengewebe bei Bedarf wieder exportiert zu werden. Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer Analysen. Besonders biochemische Charakterisierungen und ergänzende Studien zu weiteren Proteine wie die hier untersuchten, könnten Aufschluss über diese Mechanismen liefern. Hierbei könnte das Verständnis von Pathogenese und den stattfindenden Wechselwirkungen durch neue Einblicke weiter entschlüsselt und möglicherweise neue Ziele zur molekularen und/oder biotechnologischen Bekämpfung von *M.grisea* und anderen verwandten phytopathogenen Pilzen identifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte durch vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass NTT-antisense Kartoffelknollen mit einer verringerten Aktivität des plastidären ATP/ADP Transporters stark veränderte Primärmetabolit-Gehalte aufweisen. Diese Knollen kennzeichnen sich des Weiteren durch eine erhöhte Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen. Besonders interessant gestalten sich hierbei die Interaktionen bei Befall von *Solanum tuberosum* Knollengewebe durch *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Bedeutung von Transportproteinen für die Virulenz von *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* anhand von Mutantenstudien untersucht. Während dieser Arbeit konnte ein neues und zuverlässiges Vektorsystem zur Generierung gezielter „K.O.“-Mutanten mittels Genunterbrechung und homologer Rekombination generiert werden. In diesem Zusammenhang konnten mehrere *Erwinia* Mutanten hergestellt werden, welche für die Expression ausgewählter Gene, die für Transportproteine kodieren, defizient sind. Hierbei wurde festgestellt, dass der Ausfall eines Aufnahmesystems für Prolin oder, für osmotisch aktive Substanzen wie Glycin-Betain für die Virulenz und die Mazeration von Kartoffelknollengewebe nicht von entscheidender Bedeutung ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein funktioneller d-Galaktonat Transporter für eine erfolgreiche Pathogenese von *Eca* auf Knollengewebe nicht erforderlich ist.

Durch weitere Experimente, mit mehreren *Eca*-Mutanten, konnte hingegen erstmals festgestellt werden, dass der Karbonsäuremetabolismus und die Aufnahme von organischen Säuren, insbesondere, von Citrat, für eine maximale *Eca*-Virulenz ausschlaggebend ist. So ist die Gewebemazeration auf Kartoffelknollen durch *Eca*-Mutante, denen ein funktionelles Cit1-Protein fehlt, deutlich geringer als bei *Eca* Wildtypzellen. Des Weiteren wurde ermittelt, dass für ein Wachstum von *Eca* auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle ein funktionelles Cit1-Protein notwendig ist. Biochemische Untersuchungen des Cit1-Proteins zeigten, dass es sich hierbei um einen hochaffinen Citrat-Transporter handelt, der die Aufnahme von Citrat im Symport mit Protonen katalysiert. Demnach wird dieser Transporter durch die bakterielle *pmf* energetisiert.

Durch weitere Analysen an NTT-antisense Knollen wurde nachgewiesen, dass sich dieses Gewebe durch eine erhöhte Resistenz gegen *Erwinia* und reduzierte Gehalte an Citrat im Vergleich zu Wildtyp Kartoffelknollen kennzeichnet. Eine Infiltration und somit eine Erhöhung der apoplastischen Citrat-Konzentration in NTT-antisense Knollen führt zur Aufhebung der erhöhten Resistenz gegenüber *Eca*. Solche Citrat-Infiltrationen steigern auch die Gewebemazeration durch *Eca* auf Wildtyp Knollen. Weiterhin führt eine Erhöhung der apoplastischen Citrat-Konzentration bei Inkubationen mit Elicitoren zu einer reduzierten

Expression Abwehr-relevanter Transkripte im Gegensatz zu Infiltrationen mit Puffer oder Glukose.

Demnach konnten die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse eine Betrachtung von Transportproteinen als Virulenzfaktoren bekräftigen. Weiterhin wurde für Citrat und den Karboxylatstoffwechsel von *Erwinia*, sowie dessen Regulation beim Wechsel von aeroben zu anaeroben Bedingungen durch den FNR-Regulator, eine übergeordnete Rolle für die Entfaltung der vollen Virulenz nachgewiesen. Diese Ergebnisse implizieren eine Funktion von Citrat als Signalmolekül an zentralen Punkten zur Determinierung von pflanzlicher Resistenz als auch bakterieller Virulenz. So könnten veränderte Citratlevel mit verantwortlich für den „Priming“-Zustand von NTT-antisense Gewebe und dessen erhöhte Pathogen-Resistenz sein.

Auch für Transportproteine von *Magnaporthe grisea* konnte eine ähnlich Bedeutung für Virulenz und Pathogenese nachgewiesen werden (Dipl. Biol. T.Becker, AG Thines). Für eines dieser Transportproteine wurde eine erfolgreiche Untersuchung der biochemischen Charakteristika durchgeführt. Hierbei konnte mittels einer Hefekomplementation, das als Rig2 bezeichnete Protein als Prolintransporter identifiziert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Agrios, G. N.** (1997) Plant pathology Academic Press, 4th Edition
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215**, 403-410
- Amoroso, G., Seimetz, N., and Sültemeyer, D.** (2003) The dc13 gene upstream of *ictB* is involved in rapid induction of the high affinity Na^+ -dependant HCO_3^- transporter in cyanobacteria. *Photosynth.Res.* **77**, 127-138
- Andersen, H. A.** (2003) Channel-tunnels: outer membrane components of type I Sec systems and multidrug efflux pumps of gram negative bacteria. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* **147**, 122-165
- Barabote, R. D., Johnson, O. L., Zetina, E., San Francisco, S. K., Fralick, J. A., and San Francisco, M. J. D.** (2003) *Erwinia chrysanthemi* *tolC* is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J.Bacteriol.* **185**, 5772-5778
- Barras, F., Bortoli German, I., Bauzan, M., Rouvier, J., and Gey, C.** (1992) Stereochemistry of the hydrolysis reaction catalyzed by endoglucanase Z from *Erwinia chrysanthemi*. *FEBS Lett.* **300**, 145-148
- Bell, K. S., Sebahia, M., Pritchard, L., Holden, M. T. G., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher, L. J. C., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertcak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M. A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G. P. C., Birch, P. R. J., Parkhill, J., and Toth, I. K.** (2004) Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 11105-11110
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P., and Wandersman, C.** (1997) Protein secretion by gram negative bacterial ABC exporters. *Gene* **172**, 7-11
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523
- Bishop, P. D., Markus, D. J., Pearce, G., and Ryan, C. A.** (1981) Proteinase-inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymatically released from cell walls. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**, 3536-3540

- Boch, J., Verbsky, M. L., Roberston, T. L., Larkin, J. C., and Kunkel, B. N.** (1998) Analysis of resistance gene-mediated defense responses in *Arabidopsis thaliana* plants carrying a mutation in CPR5. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **12**, 1196-1206
- Boller, T.** (1987) Hydrolytic enzymes in plant disease resistance *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. J.L.Key and T.Kosuge, eds., Alan R.Liss, New York, 345-413
- Bonasera, J. M., Kim, J. F., and Beer, S. V.** (2006) PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC.Plant Biol.* **6**, 23-
- Bonhoff, A., Reith, B., Golecki, J., and Grisbach, H.** (1987) Race cultivar-specific differences in callose deposition in soybean roots following infection with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Planta* **172**, 101-105
- Boorsma, A., van der Rest, M. E., Lolkema, J. S., and Konings, W. N.** (1996) Secondary transporters for citrate and the Mg^{2+} -Citrate complex in *Bacillus subtilis* are homologous proteins. *J.Bacteriol.* **178**, 6216-6222
- Bott, M., Meyer, M., and Dimroth, P.** (1995) Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumonia*. *Mol.Microbiol.* **18**, 533-546
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254
- Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., and Gustin, M. C.** (1993) An osmosensing transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760-1763
- Bucanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R. L.** (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Biologists, print.2000 by Courier Companies Inc.(USA)
- Bullock W.O., Fernandez J.M., and Short, J. M.** (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-378
- Burr, T., Barnard, A. M., Corbett, M. J., Pemberton, C. L., Simpson, N. J., and Salmond, G. P. C.** (2006) Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*: the VirR repressor. *Mol.Microbiol.* **59**, 113-125
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M. S.** (2004) The Phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **17**, 43-54
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M. S.** (2004) NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in in vitro competition with other epiphytic bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**, 693-703

- Bülow, L.** (2006) Anaerobe und pathogen-induzierte Resistenzgenexpression in transgenen Kartoffeln Dissertation TU Carolo Wilhelmina zu Braunschweig
- Casper, T., Huber, S. C., and Sommerville, C. R.** (1986) Alterations in growth, photosynthesis and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in chloroplast phosphoglucose mutase activity. *Plant Physiol.* **79**, 1-7
- Chivasa, S. and Carr, J. P.** (1998) Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *Plant Cell* **10**, 1489-1498
- Chomczynski, P.** (1993) A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and Protein from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532-537
- Choquet, G., Jehan, N., Pissavin, C., Blanco, C., and Jebbar, M.** (2005) OusB, a broad-specificity ABC-type transporter from *Erwinia chrysanthemi*, mediates uptake of glycine betaine and choline with a high affinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3389-3398
- Christie, P. J.** (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* **40**, 294-305
- Chumley, F. G. and Valent, B.** (1990) Genetic analysis of melanin deficient, non-pathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**, 135-143
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **79**, 7624-7628
- Collmer, A. and Keen, N. T.** (1986) The role of the pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 383-409
- Collmer, A., Ried, J. L., and Mount, M. S.** (1988) Assay methods for pectic enzymes. *Methods Enzymol.* **161**, 329-335
- Conrath, U. and Kaus, H.** (2000) Das "Immunsystem" der Pflanze. *Biologie in unserer Zeit* **4**, 202-208
- Conrath, U., Katz, V., Schwindling, S., and Köhler, A.** (2001) Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 113-119
- Conrath, U., Pieterse, C., and Mauch-Mani, B.** (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7**, 210-216
- Conrath, U., Linke, C., Jeblick, W., Geigenberger, P., Quick, W. P., and Neuhaus, H. E.** (2003) Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tubers, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. *Planta* **19**, 75-83
- Constadinidiou, C., Hobman, J. L., Griffiths, L., Patel, M. D., Penn, C. W., Cole, J. A., and Overton, T. W.** (2006) A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth *J. Biol. Chem.* **281**, 4802-4815

- Cramer, H. H.** (1967) Pflanzenschutz und Welternte. Pflanzenschutz-Nachr."Bayer" **20**, 171-201
- Darvill, A. G. and Albersheim, P.** (1984) Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. Ann.Rev.Plant Physiol. **35**, 243-275
- Davis, D. J., Burlak, C., and Money, N. P.** (2000) Biochemical and biomechanical aspects of apressorial development of *Magnaporthe grisea*. Advances in rice blast research, D.Tharreau, M.-H.Lebrun, N.J.Talbot, and J.-L.Notteghem, eds (Berlin: Springer Verlag), 248-256
- Davis, K. R., Lyon, G. D., Darvill, A. G., and Albersheim, P.** (1984) Host-pathogen interactions: Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. Plant Physiol **74**, 52-60
- Davis, K. R. and Ausubel, F. M.** (1989) Characterization of elicitor-induced defense responses in suspension-cultured cells of *Arabidopsis*. Mol.Plant-Microbe Interact. **2**, 363-409
- de Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnov, N., and Talbot, N. J.** (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. Nature **389**, 244-245
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., and Lamb, C.** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature **394**, 585-588
- Desai, U. J. and Pfaffle, P. K.** (1995) Single-step purification of a thermostable DNA Polymerase expressed in *Escherichia coli*. Biotechniques **19**, 780-784
- DeZwaan, T. M., Carroll, A. J., Valent, B., and Sweigard, J. A.** (1999) *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive surface cues. Plant Cell **11**, 2013-2030
- Dharmadi, Y., Murarka, A., and Gonzalez, R.** (2006) Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. Biotechnol.Bioeng. **94**, 821-829
- Dixon, K. P., Xu, J.-R., Smirnov, N., and Talbot, N. J.** (1999) Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell **11**, 2045-2058
- Dixon, R. A., Harrison, M. J., and Lamb, C. J.** (1994) Early events in the activation of plant defense responses. Ann.Rev.Phytopathol. **32**, 497-501
- Dixon, R. A.** (2001) Natural products and plant disease resistance. Nature **411**, 843-847
- Domingue, G. J. Sr. and Woody, H. B.** (1997) Bacterial persistence and expression of disease. Clin.Microb.Rev. **10**, 320-344

- Driessen, A. J., Fekles, P., and van der Wolf, J. P.** (1998) The Sec system. *Curr.Opin.Microbiol.* **2**, 216-222
- Dufresne, M. and Osbourn, A. E.** (2001) Defenition of tissue-specific and general requirements for plant infection in a phytopathogenic fungus. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **14**, 300-307
- Durner, J., Wendehenne, D., and Klessig, D. F.** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 10328-10333
- Ebel, J. and Cosio, E. G.** (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int Rev Cytol* **148**, 1-36
- Eriksson, A. R., Anderson, R. A., Pirhonen, M., and Pavla, E. T.** (1998) Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **11**, 743-752
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L., and Alvarez, M. E.** (2004) Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **17**, 343-350
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., Lucas, C., and Brandt, A.** (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the Glycerol/H⁺ symporter in *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol.Bio.Cell.* **16**, 2068-2076
- Finlay, B. B. and Falkow, S.** (1997) Common themes in microbial pathogenicty revisited. *Mol.Bio.Rev.* **16**, 136-169
- Fischer, W.-N., Loo, D. D. F., Koch, W., Ludewig, U., Boorer, K. J., Tegeder, M., Rentsch, D., Wright, E. M., and Frommer, W. B.** (2002) Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *Plant J.* **29**, 717-731
- Fischer, W., Haas, R., and Odenbreit, S.** (2002) Type IV secretion systems in pathogenic bacteria. *Int.J.Med.Microbiol.* **292**, 159-168
- Flor, H. H.** (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Ann.Rev.Phytopathol.* **9**, 275-296
- Franke, W.** (1989) *Nutzpflanzenkunde: Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen.* Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Frühwald, J.** (2006) Charkterisierung nicht mitochondrialer Nukleotid-Transportproteine. Diplomarbeit, TU Kaiserslautern
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R.** (2003) Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovrum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp.nov., *Pectobacterium betavosculorum*, *Pectobacterium wasabiae* sp.nov. *Int.Syst.Evol.Microbiol.* **53**, 381-391

- Geider, K., Hohmeyer, C., Haas, R., and Meyer, T. F.** (1985) A plasmid cloning system utilizing replication and packaging functions of the filamentous bacteriophage fd. *Gene* **33**, 341-349
- Geider, K. and Baldes, R.** (1988) Influence of fd gene 2-protein and the viral replication origin on the compatibility of pfd-plasmids. *Nucl.Acids Res.* **16**, 6385-6396
- Geigenberger, P., Stamme, C., Tjaden, J., Schulz, A., Quick, P. W., Betsche, T., Kersting, H. J., and Neuhaus, H. E.** (2001) Tuber physiology and properties of starch from tubers of transgenic potato plants with altered plastidic adenylate transporter activity. *Plant Physiol* **125**, 1667-1678
- Gloux, K., Touze, T., Pagot, Y., Jouan, B., and Blanco, C.** (2005) Mutations of OusA alter the virulence of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **18**, 150-157
- Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1987) Biochemical responses of plants to pathogens. *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, John Wiley, New York, 229-254
- Hajirezaei, M.-R., Takahata, Y., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., and Sonnewald, U.** (2000) Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *J.Exp.Bot.* **51**, 439-445
- Hall, J. A. and Pajor, A. M.** (2005) Functional characterization of a Na(+)-coupled dicarboxylate carrier protein from *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* **187**, 5189-5194
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580
- Harris, S. J., Shih, Y. L., Bentley, S. D., and Salmond, G. P. C.** (1998) The hexA gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. *Mol.Microbiol.* **28**, 705-717
- He, S. Y. and Collmer, A.** (1990) Molecular cloning, nucleotide sequence, and marker exchange mutagenesis of the exo-poly-alpha-D-galacturonidase encoding *pehX* gene of *Erwinia chrysanthemi*. *J.Bacteriol.* **172**, 4988-4995
- Heath, M. C.** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr.Opin.Plant Biol.* **3**, 315-319
- Heitefuss, R., König, K., Obst, A., and Reschke, M.** (1993) *Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau*. 3.erw.Auflage DLG Verlag Frankfurt (Main), BLV-Verl.-Ges.München, Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup, Österreichischer Agrarverlag Wien, Bugra Suisse Wabern-Bern
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., and Nataro, J. P.** (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **9**, 370-378
- Henke, J. M. and Bassler, B. L.** (2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J.Bacteriol.* **186**, 6902-6914

- Henrich, B. and Schmidtberger, B.** (1995) Positive selection vector with enhanced lytic potential based on a variant of phi X174 phage gene E. *Gene* **154**, 51-54
- Hiser, C. and McIntosh, L.** (1990) Alternative oxidase of potato is an integral membrane protein synthesized de novo during aging of tuber slices. *Plant Physiol* **93**, 312-318
- Howard, R. J. and Ferrari, M. A.** (1989) Role of melanin in appressorium formation. *Exp.Mycol.* **13**, 403-418
- Hueck, C. J.** (2006) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 379-433
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and Reverchon, S.** (2001) Two transporters, TogT and TogMNAB are responsible for the oligogalacturonide uptake in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol.Microbiol.* **41**, 1125-1132
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Blot, N., and Reverchon, S.** (2001) Identification of TogMNAB, an ABC transporter which mediates the uptake of pectic oligomers in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol.Microbiol.* **41**, 1113-1123
- Hunter, R. E.** (1974) Inactivation of pectic enzymes by polyphenols in cotton seedlings of different ages infected with *Rhizoctonia solani*. *Physiol.Pl.Pathol.* **4**, 151-159
- Idnurm, A. and Howlett, B. J.** (2002) Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). *Eukary.Cell* **1**, 719-724
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kröger, A., and Unden, G.** (2002) C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim.Biophys.Acta* **1553**, 39-56
- Kästner, C. N., Schneider, K., Dimroth, P., and Pos, K. M.** (2002) Characterization of the citrate/acetate antiporter CitW of *Klebsiella pneumoniae*. *Arch.Microbiol.* **177**, 500-506
- Kästner, C. N., Prummer, M., Sick, B., Renn, A., Wild, U. P., and Dimroth, P.** (2003) The citrate carrier CitS probed by single-molecule fluorescence spectroscopy. *Biophys.J.* **84**, 1651-1659
- Kelemu, S. and Collmer, A.** (1993) *Erwinia chrysanthemi* EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isozymes. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**, 1756-1761
- Kim, W. S., Schollmeyer, M., Nimtz, M., Wray, V., and Geider, K.** (2002) Genetics of biosynthesis and structure of the capsular exopolysaccharide from the Asian pear pathogen *Erwinia pyrifoliae*. *Microbiol.* **148**, 4015-4024
- Klement, Z.** (1982) Hypersensitivity. *Phytopathogenic Prokaryotes, Vol2* (Mount, M.S.and Lacy, H.H.eds.). New York, Academic Press, 149-177
- Kombrink, E. and Somssich, I. E.** (1997) Pathogenesis-related proteins and plant defense. *The Mycota, Part A.Ed.:* Caroll G., Tudzynski P., Springer Verlag, Berlin. **5**, 107-128
- Kotoujansky, A.** (1987) Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinia* *Ann.Rev.Phytopathol.* **25**, 405-430

- Lamb, C. and Dixon, R.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **48**, 251-275
- Langerfeld, E.** (1989) Die bakterielle Ringfäule der Kartoffel (*Clavibacter michiganensis* subsp. *spededonicus* Davies *et al.*) aus biologischer, epidemiologischer, ökologischer und ökonomischer Sicht. *Nachrichtenbl.Dtsch.Pfl.-schutzd.* **41**, 153-159
- Laties, G. G.** (1982) The cyanide-resistant, alternative path in higher plant respiration. *Ann.Rev.Plant Physiol.* **33**, 519-555
- Laurent, F., Kotoujansky, A., Labesse, G., and Bertheau, Y.** (1993) Characterization and overexpression of the pem gene encoding pectin methylesterase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Gene* **131**, 17-25
- Lengeler, J. W., Drews, G., and Schlegel, H. G.** (1999) Biology of the prokaryotes. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Li, H. and Pajor, A. M.** (2002) Functional characterization of CitM, the Mg^{2+} -Citrate Transporter. *J.Memb.Biol.* **185**, 9-16
- Lin, E. C. C. and Iuchi, S.** (1991) Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in *Escherichia coli* and related bacteria. *Annu.Rev.Genet.* **25**, 361-387
- Link, A. J., Phillips, D., and Church, G. M.** (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J.Bacteriol.* **179**, 6228-6237
- Linke, C., Conrath, U., Jeblick, W., Betsche, T., Mahn, A., Düring, K., and Neuhaus, H. E.** (2002) Inhibition of the plastidic ATP/ADP-transporter protein primes potato tubers for augmented elicitation of defense responses and enhances their resistance against *Erwinia carotovora* *Plant Physiol.* **129**, 1607-1615
- Linke, C.** (2003) Grundlagen der *Erwinia*-Resistenz transgener Kartoffelknollen mit verringerter Akktivität des plastidären ATP/ADP-Transporters (AATP1, *St*) Dissertation, TU Kaiserslautern
- Lipton, W. J.** (1967) Some effects of low-oxygen atmospheres on potato tubers. *Am.Potato J.* **44**, 292-299
- Lolkema, J. S., Sobczak, I., and Slotboom, D.-J.** (2005) Secondary transporters of the 2HCT family contain two homologous domains with inverted membrane topology and trans re-entrant loops. *FEBS Journal* **272**, 2334-2344
- Lorenz, M. C. and Fink, G. R.** (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**, 83-86
- Lund, B. M. and Wyatt, G. M.** (1972) The effect of oxygen and carbon dioxide concentrations on a bacterial soft rot of potatoes. I. King Edwards potatoes inoculated with *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. *Potato Res.* **15**, 174-179

- Mahe, B., Masclaux, C., Rauscher, L., Enard, C., and Expert, D.** (1995) Differential expression of two siderophore-dependant iron-acquisition pathways in *Erwinia crysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family. *Mol. Microbiol.* **18**, 33-43
- Markovich, D. and Murer, H.** (2002) The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch.* **447**, 594-602
- Mazau, D. and Esquerré-Tugayé, M. T.** (1986) Hydroxyprolin-rich glycoprotein accumulation in the plant cell wall of plants infected by various pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **29**, 147-157
- McIntosh, L.** (1994) Molecular Biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol* **105**, 781-786
- McKinney, J. D., Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchettini, J. C., Jacobs, W. R., and Russell, D. G.** (2000) Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**, 735-738
- Meeuse, B. J. D.** (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**, 117-126
- Metzger, M., Bellemann, P., Schwartz, T., and Geider, K.** (1992) Site directed and transposon-mediated mutagenesis with pfd-plasmids by electroporation of *Erwinia amylovora* and *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.* **20**, 2265-2270
- Miroux, B. and Walker, J. E.** (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289-298
- Molina, J. J. and Harrison, M. D.** (1977) The role of *Erwinia carotovora* in the epidemiology of potato blackleg. I. Relationship of *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* to potato blackleg in Colorado. *Am. Potato J.* **54**, 587-591
- Money, N. P.** (1997) Mechanism linking cellular pigmentation and pathogenicity in rice blast disease. *Fungal Genet. Biol.* **22**, 151-152
- Moore, A. L. and Siedow, J. N.** (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1059**, 121-140
- Moore, L. J., Mettert, E. L., and Kiley, P. J.** (2006) Regulation of FNR dimerization by subunit charge repulsion. *J. Biol. Chem.*, ahead of print-
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U., and Willmitzer, L.** (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**, 1229-1238
- Nam, H. S., Anderson, A. J., Yang, K. Y., Cho, B. H., and Kim, Y. C.** (2006) The *dctA* gene of *Pseudomonas chlororaphis* O6 is under RpoN control and is required for effective

- root colonization and induction of systemic resistance. FEMS Microbiol.Lett. **256**, 98-104
- Navarre, D. A., Wendehenne, D., Durner, J., Noad, R., and Klessig, D. F.** (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. Plant Physiol. **122**, 573-582
- Nielson, L. W.** (1968) Accumulation of respiratory CO₂ around tubers in relation to bacterial soft rot. Am.Potato J. **45**, 179-181
- Okinaka, Y., Yang, C.-H., Perna, N. T., and Keen, N. T.** (2002) Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. Mol.Plant-Microbe Interact. **15**, 619-629
- Pajor, A. M.** (1999) Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates. Ann.Rev.Physiol. **61**, 663-682
- Pajor, A. M.** (1999) Citrate transport by the kidney and intestine. Semin.Nephrol. **19**, 195-200
- Parakash, S., Cooper, G., Singhi, S., and Saier, M. H.** (2003) The ion transporter superfamily. Biochim.Biophys.Acta **1618**, 79-92
- Pavla, T. K., Holmström, K. O., Heino, P., and Palva, E. T.** (1993) Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. Mol.Plant-Microbe Interact. **6**, 190-196
- Peng, M. and Kuc, J.** (2006) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vivo and on tobacco leaf discs. Phytopathology **82**, 696-699
- Pérembelon, M. C. M. and Lowe, R.** (1975) Studies an the initiation of bacterial soft rot in potato tubers. Potato Res. **18**, 64-82
- Pérembelon, M. C. M. and Kelman, A.** (1980) Ecology of the soft rot *Erwinias*. Ann.Rev.Phytopathol. **18**, 361-387
- Pirhonen, M., Saarilathi, H., Karlsson, M. B., and Palva, E. T.** (1991) Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* by transposon mutagenesis. Mol.Plant-Microbe Interact. **4**, 276-283
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., and Palva, E. T.** (1993) A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. EMBO J. **12**, 2467-2476
- Pos, K. M. and Dimroth, P.** (1996) Functional properties of the purified Na⁺-dependant citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*: evidence for asymmetric orientation of the carrier protein in proteoliposomes. Biochemistry **35**, 1018-1026
- Pos, K. M., Dimroth, P., and Bott, M.** (1998) The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts J.Bacteriol. **180**, 4160-4165
- Ramsey, G. B., Lutz, J. M., Werner, H. O., and Edgar, A. D.** (1944) Experiments on shipping washed early potatoes. Bull.Neb.Exp.Sin. **364**

- Rauscher, M. D.** (2001) Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* **411**, 857-864
- Renne, P., Dressen, U., Hebbeker, U., Hille, D., Flügge, U. I., Westhoff, P., and Weber, A. P.** (2003) The *Arabidopsis* mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. *Plant J.* **35**, 316-331
- Rentsch, D., Laloi, M., Schmelzer, E., Delrot, S., and Frommer, W. B.** (1995) NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **370**, 264-268
- Robinson, C. and Bolhuis, A.** (2001) Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 350-356
- Ross, A. F.** (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**, 340-358
- Saewers, G. and Suppmann, B.** (1992) Anaerobic induction of pyruvate formate-lyase gene expression is mediated by the ArcA and FNR proteins. *J.Bacteriol.* **174**, 3474-3478
- Saier, M. H.** (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **64**, 354-411
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A.** (1987) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo-stable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* New York, USA **Cold Spring Harbor Laboratory**
- Sandkvist, M.** (2006) Type II secretion and pathogenesis. *Infect.and Immun.* **69**, 3523-3535
- Sauvage, C., Franza, T., and Expert, D.** (1996) Analysis of the *Erwinia chrysanthemi* Ferrichrysobactin receptor genes:resemblance to the *Escherichia coli* *fepA-fes* bidirectional promoter region and homology with hydroxamate receptors. *J.Bacteriol.* **178**, 1227-1231
- Scheel, D.** (1991) Plant defense genes. *Pesticide chemistry*.Ed.:Frehse H, VCH-Verlagsgesellschaft, Basel, Schweiz., 121-130
- Scheel, D.** (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr.Opin.Plant Biol.* **1**, 305-310
- Scholey, J. and Whitebread, R.** (1968) A pathological problem associated with pre-packing of potato tubers. *Plant Pathol.* **17**, 135-139
- Schwan, W. R., Lehmann, L., and McCormick, J.** (2006) Transcriptional activation of the *Staphylococcus aureus* *putP* gene by low-proline-high osmotic conditions and during infection of murine and human tissues. *Infect.and Immun.* **74**, 399-409
- Schwarz, E. and Oesterhelt, D.** (1985) Cloning and expression of *Klebsiella pneumoniae* genes coding for citrate transport and fermentation. *EMBO J.* **4**, 1599-1603

- Sequeira, L.** (1978) Lectins and their role in host-pathogen specificity. *Ann.Rev.Phytopathol.* **16**, 453-469
- Simmons, J. S.** (1926) A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes group and for certain fungi. *J.Infect.Dis.* **39**, 209-241
- Sinden, S. L., Kobayashi, R. S., and Nordeen, R. O.** (1993) Perspectives on controlling potato soft rot with foreign genes for antimicrobial compounds. *Acta Horticulturae* **336**, 79-83
- Smid, E. J., Jansen, A. H. J., and Tuijn, C. J.** (1993) Anaerobic nitrate respiration by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* during potato tuber invasion. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**, 3648-3653
- Sokol, P. A., Darling, P., Lewenza, S., Corbett, C. R., and Kooi, C. D.** (2000) Identification of a siderophore receptor required for ferric ornibactin uptake in *Burkholderia cepacia*. *Infect.and Immun.* **68**, 6554-6560
- Somssich, I. E. and Hahlbrock, K.** (1998) Pathogen defense in plants a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* **3**, 86-90
- Spiegelhalter, F. and Bremer, E.** (1998) Osmoregulation of the putE proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependant stress-responsive promoters. *Mol.Microbiol.* **29**, 285-296
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W.** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89
- Sweetlove, L. J., Burrell, M. M., and ap Rees, T.** (1996) Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochem.J.* **320**, 493-498
- Talbot, N. J.** (2003) On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Ann.Rev.Microbiol.* **57**, 177-202
- Tang, D.-J., He, Y.-Q., Feng, J.-Y., He, B.-R., Jiang, B.-L., Lu, G.-T., Chen, B., and Tang, J.-L.** (2005) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* possesses a single gluconeogenic pathway that is required for virulence. *J.Bacteriol.* **187**, 6231-6237
- Thomson, N. R., Cox, A., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Williams, P., and Salmond, G. P. C.** (1997) The rap and hor proteins of *Erwinia*, *Serratia*, *Yersinia*: a novel subgroup in a growing superfamily of proteins regulating diverse physiological processes in bacterial pathogens. *Mol.Microbiol.* **26**, 531-544
- Tikhonova, E. B. and Zgurskaya, H. I.** (2004) AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *J.Biol.Chem.* **279**, 32116-32124
- Tjaden, J., Mohlmann, T., Kampfenkel, K., Henrichs, G., and Neuhaus, H. E.** (1998) Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *Plant Journal* **16**, 531-540

- Toraya, T., Kuno, S., and Fukui, S.** (1980) Distribution of coenzyme B₁₂-dependant diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*. J.Bacteriol. **141**, 1439-1442
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., and Birch, P. R. J.** (2003) Soft rot *Erwiniae*: from genes to genomes. Mol.Plant.Pathol. **4**, 17-30
- Townsend, D. E. and Wilkinson, B. J.** (2006) Proline transport in *Staphylococcus aureus*: a high affinity system and a low affinity system involved in osmoregulation. J.Bacteriol. **174**, 2702-2710
- Tucker, S. L., Thornton, C. R., Tasker, K., Jacob, C., Giles, G., Egan, M., and Talbot, N. J.** (2004) A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. Plant Cell **16**, 1575-1588
- Uknes, S. J., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. A.** (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell **4**, 645-656
- Ullmann, R., Gross, R., Simon, J., Unden, G., and Kröger, A.** (2000) Transport of C₄-dicarboxylates in *Wolinella succinogenes*. J.Bacteriol. **182**, 5757-5764
- van der Rest, M. E., Schwarz, E., Oesterhelt, D., and Konings, W. N.** (1990) DNA sequence of a citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*. Eur.J.Biochem. **189**, 401-407
- van der Rest, M. E., Abee, T., Molenaar, D., and Konings, W. N.** (1991) Mechanism and energetics of a citrate-transport system of *Klebsiella pneumoniae*. Eur.J.Biochem. **195**, 71-77
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A.** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol.Mol.Plant Pathol. **55**, 85-97
- Vance, C. P., Kirk, T. K., and Sherwood, R. T.** (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann.Rev.Phytopathol. **18**, 259-288
- Varela, M. F. and Wilson, T. H.** (1996) Molecular biology of the lactose carrier of *Escherichia coli*. Biochim.Biophys.Acta **1**, 21-34
- Vereecke, D., Cornelis, K., Temmermann, W., Jaziri, M., van Montagu, M., Holsters, M., and Goethals, K.** (2002) Chromosomal locus that affects pathogenicity of *Rhodococcus fascians*. J.Bacteriol. **184**, 1112-1120
- Vidal, S., Ponce de Léon, I., Denecke, J., and Pavla, E. T.** (1997) Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. Plant J. **11**, 115-123
- Vidal, S., Eriksson, A. R. B., Montesano, M., Denecke, J., and Palva, E. T.** (1998) Cell wall-degradating enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic

- acid-dependant induction of a plant defense response. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **11**, 23-32
- Viprey, V., DelGreco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J., and Perret, X.** (1998) Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol.Microbiol.* **28**, 1381-1389
- Vílchez, S., Molina, L., Ramos, C., and Ramos, J. L.** (2000) Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: cloning, characterization and expression of the put genes in the presence of root exudates. *J.Bacteriol.* **182**, 91-99
- von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M., and Bremer, E.** (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol.Microbiol.* **25**, 175-187
- Walker, D.** (1992) Potato brown rot, *Pseudomonas solanacearum*. *Pl.Disease Notice.Centr.Sci.Lab.Harpenden, Herts* Nr. **73**
- Wang, Z. Y., Thornton, C. R., Kershaw, M. J., Debaio, L., and Talbot, N. J.** (2003) The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol.Microbiol.* **47**, 1601-1612
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P., and Ryals, J. A.** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094
- Warner, J. B., Krom, B. P., Magni, C., Konings, W. N., and Lolkema, J. S.** (2000) Catabolite repression and induction of the Mg^{2+} -Citrate transporter CitM of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **182**, 6099-6105
- Warner, J. B. and Lolkema, J. S.** (2002) Growth of *Bacillus subtilis* on citrate and isocitrate is supported by the Mg^{2+} -citrate transporter CitM. *Microbiol.* **148**, 3405-3412
- Wassenaar, T. M. and Gaastra, W.** (2001) Bacterial virulence: Can we draw the line? *FEMS Microbiol.Lett.* **9995**, 1-7
- Weinstock, G. M.** (2000) Genomics and bacterial pathogenesis. *Emerg.Infect.Dis.* **6**, 496-504
- Wendt, U. K., Wenderoth, I., Tegeler, A., and Von, S. A.** (2000) Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.) *Plant J.* **23**, 723-733
- Wengender, P. A. and Miller, K. J.** (1995) Identification of a PutP proline permease gene homolog from *Staphylococcus aureus* by expression cloning of the high-affinity proline transport system in *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**, 252-259
- West, I. C.** (1997) Ligand conduction and the gated-pore mechanism of transmembrane transport. *Biochim.Biophys.Acta* **3**, 213-234

- Wharam, S., Mulholland, V., and Salmond, G. P. C.** (1995) Conserved virulence factor regulation and secretion apparatus in bacterial pathogens of plants and animals. *Eur.J.Plant Pathol.* **101**, 1-13
- Wieczorke, R., Dlugai, S., Krampe, S., and Boles, E.** (2003) Characterization of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. *Cell.Physiol.Biochem.* **13**, 123-134
- Workman, M. and Twomey, J.** (1969) The influence of storage atmosphere and the temperature on the physiology and performance of "Russet Burbank" seed potatoes. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* **94**, 260-263
- Yip, C. K. and Strynadka, N. C. J.** (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system *Trends Biochem.Sci.* **31**, 223-230
- Ynag, S., Perna, N. T., Cooksey, D. A., Okinaka, Y., Lindow, S. E., Ibekwe, A. M., Keen, N. T., and Yang, C.-H.** (2004) Genome-wide identification of plant-upregulated genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 using a GFP-based IVET leaf array. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **17**, 999-1008
- Yu, I. C., Parker, J., and Bent, A. F.** (1998) Gene for gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** , 7819-7824
- Zeigler, R. S.** (1998) Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Ann.Rev.Phytopathol.* **36**, 249-275
- Zhao, Y., Blumer, S. E., and Sundin, G. W.** (2005) Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J.Bacteriol.* **187**, 8088-8103
- Zientz, E., Janausch, I. G., Six, S., and Uden, G.** (1999) Functioning of DcuC as the C₄-dicarboxylate carrier during Glucose fermentation by *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **181**, 3716-3720

7 Anhang

I. Oligonukleotide

Name	Basenpaarsequenz
T3 Promoter Primer	5'- ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA - 3'
T7 Promoter Primer	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'
M13-for	5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'
M13-rev	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
PET-KOZAK	5'- AAG GAG ATC CAC CAT GGG CCA TC - 3'
PET-anti	5'- CCT TTC GGG CTT TGGT TAG CAG C - 3'
pEco s	5'- GAC GCT CAG TGG AAC GAG AAT TCA CGT TAA GGG ATT TTG G - 3'
pEco as	5'- CCA AAA TCC CTT AAC GTG AAT TCT CGT TCC ACT GAG CGT C - 3'
Kan s	5'- GCT GAT TTA TAT GGG TAT AAA TGG GCT CGC - 3'
Kan as	5'- GGA GAA AAC TCA CCG AGG CAG TTC CAT AG - 3'
pET vo	5'- ATA GGG GAA TTG TGA GCG - 3'
pET hi	5'- CCC AAG GGG TTA TGC TA - 3'
clm s	5'- GGC ACG TAA GAG GTT CCA ACT TTC AC - 3'
clm as	5'- GGC GTA GCA CCA GGC GTT TAA G- 3'
MCS s	5'- CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG TAC - 3'
MCS as	5'- CCG GGG ATC CTC TAG AGT CGA CCT GCA GGC ATG - 3'
putP s	5'- GAG AGT TAA ATG ACA ATA AGC - 3'
putP as	5'- GTG CCA CGA GTG TTA TGA CTA AAC - 3'
putP up500 s	5'- CCT GTT CGG CGA AAT CAA GAA AGG GTT G - 3'

Name	Basenpaarsequenz
dgoT s	5'- CTG TTA TTA AGC TTC AAT GAG CGA ACC GCG - 3'
dgoT as	5'- CGA CTT TAA TTC CTC CAG AAT GGC - 3'
dgoT up500 s	5'- GGC TGC TCT TGT GCA GCA TTA C - 3'
dcuA s	5'- GGA GCA TAC ATA TGC TTG GTC TTG - 3'
dcuA as	5'- GCT CGA GGG GCA ATC TTT AGA TCA G - 3'
4400 s	5'- CCG TTC ATA TGA AGA GTG GTG - 3'
4400 as	5'- CCT CGA GTT ACC AGA AAC - 3'
cit1 s	5'- CCC GAT TAA GGA AAA CAT ATG AAG ACC - 3'
cit1 as	5'- CAT CTA TTA GCT CGA GAT CAA TAC AGG TCG - 3'
cit1 kompl	5'- CCA AAT CAA TAA GCC GAC - 3'
cit1 up500 s	5'- GGA CAG ATC GAA TGT CAG AAT TC - 3'
citM s	5'- GGA AGT CAT ATG CTA GCT C - 3'
citM as	5'- CCT CGA GTT CCC TAT AAG - 3'
citM-Xcc s	5'- GGA TTT GCC CAT ATG CTG AC - 3'
citM-Xcc as	5'- GCT TTT GCG ATT CCC CAT TC - 3'
proW s	5'- GGA GTG ACA TAT GAG TAA ATC - 3'
proW as	5'- GCG GCT CGA GTG TTA CTG CTT G - 3'
proP s	5'- GGA AAA ACA TAT GAG ATT AAG - 3'
proP as	5'- CCT CGT TCA GTG ACT CGA GGC TAG TT- 3'
fnr s	5'- GCA AAG CAT ATG ATC C - 3'
fnr as	5'- CTC GAG AGA CTA TTT AC - 3'
fnr (Δ EcoRI) s	5'- CGT GGT TTC TCA CCA CGT GAA TTT CGT CTG - 3'
fnr (Δ EcoRI) as	5'- CAG ACG AAA TTC ACG TGG TGA GAA ACC ACG - 3'

Name	Basenpaarsequenz
Yeplac s	5'- GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G - 3'
Yeplac as	5'- CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAA T - 3'
Rig2 s	5'- GCA TAT GGC GGA CGA GAA GGG TA - 3'
Rig2 as	5'- CGG ATC CGC TAG AAG ATC TTC TTC ACG - 3'
Rig3 s	5'- GAT AAC TGC AGA GGA AGT CAA TCA CC - 3'
Rig3 as	5'- CTT TCC TGT CAT CTC GAG CAT CAC AAG - 3'

II. Zielgene einer „K.O.“-Mutagenese

Genlokus	EMBL #	Nächstes Homolog; (E-Wert); Putative Funktion	Uniprot #
<i>Eca4218</i>	CAG77115.1	<i>putP</i> <i>Y.pestis</i> ; 0,0; Na ⁺ /Prolin Symporter	Q6CZD4
<i>Eca3503</i>	CAG76410.1	<i>ousBW</i> <i>E.chrysanthmi</i> ; 1e ⁻¹⁵⁴ , Prolin/Glycin-Betain Transporter	Q6D1E5
<i>Eca4415</i>	CAG77311.1	<i>dgoT</i> <i>E.coli</i> O6:K15:H31; 0,0; d-Galaktonat Transporter	Q6CYU0
<i>Eca3984</i>	CAG78881.1	<i>dit1</i> <i>S.oleracea</i> ; 1e ⁻¹⁰⁵ , Na ⁺ /Sulfat Symporter	Q6D017
<i>Eca4400</i>	CAG77296.1	<i>Eca3984</i> <i>E.carotovora</i> ; 0,0; Na ⁺ /Prolin Symporter	Q6CYV5
<i>Eca0620</i>	CAG73536.1	<i>dcuA</i> <i>W.succinogenes</i> ; 1e ⁻¹²⁸ , C4-di-Karboxylat Transporter	Q6CYU0
<i>Eca2207</i>	CAG75108.1	<i>fnr</i> <i>Y.pestis</i> ; 1e ⁻¹³⁷ , Fumarat Nitrat Reduktions-Regultor	Q6D535

III. Abkürzungen

AATP1(St)	Plastidärer ATP/ADP Transporter 1 aus <i>Solanum tuberosum</i>
Abb.	Abbildung
Ade	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
A.t.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Arc	Aerobic respiratory control
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
Bp bzw. bps	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCCP	Carbonyl-Cyanid- <i>m</i> -Chlorophenylhydrazon
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	Kolonien bildende Einheit (Colony forming unit)
Ci	Curie
Citr	Citrullin
Cl ⁻	Chlorid-Ion
Clm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CWDE	Zellwand abbauende Enzyme (Cell wall degradading enzymes)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT _{red}	reduziertes Dithiothreitol
<i>Eca</i>	<i>Erwinia carotovora ssp. atroseptica</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Cup	Eppendorfgefäß
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
FAO	Food and Agriculture Organisation
FNR	Funmarat Nitrat Atmung – Regulatur Protein, (Fumarate nitrate respiration)
Fum	Fumarat

GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Gluk	Glucose
Gly	Glycerin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ⁺	Proton
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
His-Tag	Histidin-„tag“ (engl. für Fortsatz, Anhang)
IBWF	Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRRI	International Rice Research Institute
Kan	Kanamycin
<i>kan^R</i>	Kanamycin-Resistenzgen
K ⁺	Kalium-Ion
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
kBq	Kilobequerel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K _M	Michaelis-Menten Konstante
„K.O.“-Mutagenese	Knock-out Mutagenese
KPi	Kaliumphosphatpuffer
λ (Lambda)	<i>Lambda/Pst</i> I DNA-Marker (Fermentas; ST.Leon-Rot)
l	Liter
LAR	Lokal erworbene Resistenz, (Local acquired resistance)
LiCl	Lithiumchlorid
μ	mikro
m	milli
M	molar
MCS	„multiple cloning site“ (multiple Klonierungsstelle)
MES	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Mililiter
mol	Einheit für die Stoffmenge
MOPS	2-(N-morpholino)Propansulfonsäure
MPI	Max Planck Institut
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure

n	nano
Na ⁺	Natrium-Ion
NaAC	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Reduziertes Nicotinamid-Adenin-dinucleotid
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NO ₃ ⁻	Nitrat
NTT	Klasse der plastidären ATP/ADP Transporter
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
p	pico
Pi	anorganisches Phosphat
p.A.	per Analysis, für Analysen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pBSK	pBluescript (SK), Klonierungsvektor
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PEC	Pektat-Medium
PEG	Polyethlenglykol
pET	Expressionsvektor
PEP	Phosphoenolpyruvat
pfu	plaque forming unit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
pmf	Protonenmotorische Kraft („proton motive force“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Pyrophosphat
PR-Proteine	Pathogen bezogene (Pathogen Related) Proteine
R	Resistenzgen
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAR	Systemisch erworbene Resistenz, (systemic acquired resistance)
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCM	Simmons Citrat Medium
Sec	Bakterielles Sekretionssystem
Sm	Streptomycin
SDS	Natrium-(„sodium“-)-dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)

ssp.	subspecies
Tab.	Tabelle
TCA	Trikarbonsäure-Zyklus
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TP	Triosephosphat
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
UNO	Vereinte Nationen
UNOFPA	Bevölkerungsfond der Vereinten Nationen
Ura	Uracil
ura3	Gen für die Uracil-Synthese
UV	ultraviolett
V	Volt
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit
v/v	Volumenprozente
w/v	Gewichtsprozente
YNB	Hefe Stickstoffbasis Yeast Nitrogene Base

IV. Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

V. Auswirkungen von Citrat auf die Expression von PR-Genen

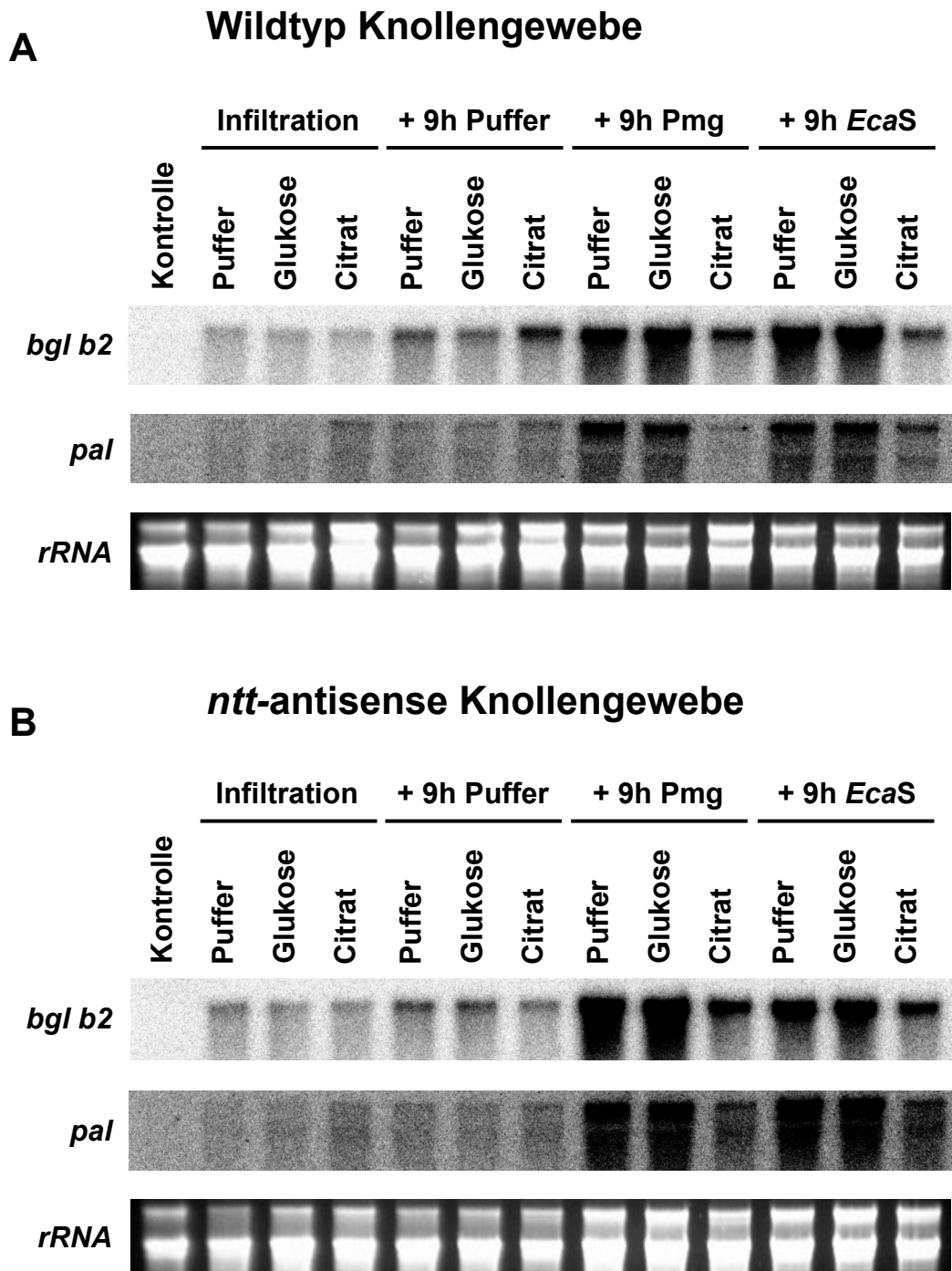


Abb. V.1: Auswirkungen der Infiltration von Knollengewebe mit verschiedenen Metaboliten auf die Expression von PR-Gen Transkripten. A) Wildtyp-Knollenscheibchen wurden mit Lösungen von jeweils 10mM Citrat, 10mM Glukose jeweils in MES-KOH (pH 5,8) oder nur mit Puffer infiltriert. Nach neunstündiger Inkubation mit Puffer oder Elizitoren der pflanzlichen Resistenz (Pmg = Zellwandpreparation von *Phytophthora megasperma*; EcaS = *Erwinia* Kulturüberstand) wurde Gesamt-RNA isoliert und die entsprechenden „Northern-Blots“ mit Sonden repräsentativer PR-Gene (*bgl b2* = β -Glukanase b2; *pal* = Phenylalanin-Ammoniak-Lyase) hybridisiert. **B)** Analoges Experiment zu A, jedoch Durchführung mit *ntt*-antisense Kartoffelscheibchen.

VI. Publikationen

Publikationsliste

Linka N., Hurka H., Lang B.F., Burger G., Winkler H.H., Stamme C., **Urbany C.**, Seil I., Kusch J., Neuhaus H.E. (2003) Phylogenetic relationship of non-mitochondrial nucleotide transport proteins in bacteria and eukaryotes. *Gene* **306**: 27-35

Daugherty R.M., Linka N., Audia J.P., **Urbany C.**, Neuhaus H.E., Winkler H.H. (2004) The nucleotide transporter of *Caedibacter caryophilus* exhibits an extended substrate spectrum compared to the analogous ATP/ADP translocase of *Rickettsia prowazekii*. *J. Bacteriol* **186**: 3262-3265

Haferkamp I., Schmitz-Esser S., Linka N., **Urbany C.**, Collingro A., Wagner M., Neuhaus H.E. (2004) A candidate NAD⁺ transporter in an intracellular bacterial symbiont related to Chlamydiae. *Nature* **432**: 622-625

Urbany C., Reinhold T., Neuhaus H.E. (2006) Citrate levels in potato tubers and citrate uptake into *Erwinia carotovora* are critical factors for bacterial virulence (in preparation)

VII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.E. Neuhaus bedanken. Durch die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und dem Bereitstellen von finanziellen und technischen Mitteln im Rahmen eines anspruchsvollen und interessanten Projektes ermöglichte er diese Arbeit. Weiterhin bedanke ich mich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die persönlichen Hilfestellungen die meine Arbeit vorantrieben. Auch Herrn Dr. E. Thines und Herrn Dipl. Biol. T. Becker gilt mein Dank. Durch die Zusammenarbeit und Kooperation wurde nicht nur ein weiterer interessanter Aspekt dieser Arbeit geschaffen, auch die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und der wissenschaftliche Austausch trugen zu einer angenehmen Zeit bei. Auch, bei den Arbeitsgruppen und Teams rund um Dr. D. Sültemeyer und Prof. Dr. M. Hahn möchte ich mich für das Entgegenkommen bei so manchem materiellen Engpass bedanken. Meine Kollegen und Freunde innerhalb und außerhalb der AG verdienen ein besonderes Dankeschön. Sie unterstützten mich nicht nur wissenschaftlich sondern vor allem auch menschlich. Ich möchte mich hier auch bei Thomas Reinhold bedanken der mich bei Teilen dieser Arbeit unterstützte. Schlussendlich VIELEN DANK an die wichtigsten Leute während meiner Zeit, meine Familie und insbesondere Kim die mich immer ermutigte und unterstützte und über so manche Durststrecke hinweg half. Ihr danke ich für viel mehr als nur diese Arbeit!

VIII. Curriculum vitae

Personal Information

Name: Claude Urbany
 Date and place of birth: 5th July 1979, Luxembourg-City (Luxembourg)
 Address: Route du vin 119, L-5440 Remerschen
 Nationality : Luxembourgish
 Email: urbicl@pt.lu

School Education

1985-1991 Ecole primaire, Commune de Remerschen
 1991-1992 Lycée Technique Joseph Bech (LTJB), Grevenmacher
 1992-1998 Lycée de Garçons de Luxembourg (LGL), Luxembourg
 - Degree: General qualification for university entrance

Study of Biological Sciences and Ph.D. Thesis

1998-1999 Centre universitaire Luxembourg (CUNLUX), Lux.
 Study of Natural Sciences, main focus: Chemistry/Biology
 - Degree: Certificat d'études scientifiques
 1999-2003 Technische Universität Kaiserslautern (Germany)
 Diploma study of biological sciences, main subjects: Plant Physiology, Microbiology and Biochemistry
 - Degree: Diplom Biologe
 - Diplomarbeit: Characterisation of non-mitochondrial Nucleotide Transport Proteins (Charakterisierung nicht-mitochondrialer NTTs)
 2003-until now Promotion Dr. rer. nat. at the Technische Universität Kaiserslautern, Plant Physiology Chair of Prof. H.E. Neuhaus (Dean Department of Biological Sciences)
 - Subject: Transportproteins in *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (Transportproteine in *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*)

Additional Activities during Study

03.2003 Radiation Safety Course, Technical Academy Southwest e.V. (TAS)
 - technical qualification in Radiation Safety for groups 2.2. and 4.2. according to German Law (Rd. Schr. d. BMI v.17.09.1982)

11.2004-07.2005

ExTra – Business start-up Training TU Kaiserslautern
- Certified theoretical and practical knowledge in company
formation and business conduction (06.09.2005)

Professional career

Since 11.09.03

Research Assistant at the TU Kaiserslautern, Chair of Prof.
H.E.Neuhaus, teaching and supervision of under-graduate
students and practical courses in plant physiology and botany

Additional Skills

Languages:

Luxembourgish, German, French and English

Computer literacy:

sound knowledge in Microsoft Office and image processing on
Windows based- and Mac systems
Expertise in molecular biology in-silico tools e.g.
Clonemanager, Genedoc, Primer Premier and tool collections
on NCBI and Expasy

IX. Eidstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet wurden.

Ich versichere, dass ich weder an Technischen Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, Dezember 2006

(Claude Urbany)